N° d'enregistrement
C N R S
A. O. 7521

THÈSE

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES
DE LA VIE ET DE L'ENVIRONNEMENT
DE L'UNIVERSITE DE DIJON

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

par

Jean-Claude VALLEE

●

1973

Quelques Aspects du Métabolisme de la Proline chez divers Nicotiana en fonction du Développement

Soutenue le 19 JANV. 1973 *devant la Commission d'Examen*

MM. C. ARNAL — *Président*
R. ULRICH, C. BARON, C. MARTIN — *Examinateurs*

Institut National de la Recherche Agronomique
Station de Physiopathologie végétale - DIJON

N° d'enregistrement
C N R S
A. O. 7521

THÈSE

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES
DE LA VIE ET DE L'ENVIRONNEMENT
DE L'UNIVERSITE DE DIJON

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

par

Jean-Claude VALLEE

●

Quelques Aspects du Métabolisme de la Proline chez divers Nicotiana en fonction du Développement

Soutenue le 19 JANV. 1973 *devant la Commission d'Examen*

MM. C. ARNAL *Président*
R. ULRICH
C. BARON *Examinateurs*
C. MARTIN

Institut National de la Recherche Agronomique
Station de Physiopathologie végétale - DIJON

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

AVANT - PROPOS

Ce travail a été réalisé à la Station de Physiopathologie Végétale de DIJON dirigée par Monsieur C. MARTIN. Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance pour l'aide et les conseils qu'il m'a apportés ainsi que pour son enthousiasme dans la recherche, qu'il a toujours su faire partager.

J'adresse tous mes remerciements à Monsieur le Professeur C. ARNAL qui, après m'avoir enseigné la Physiologie Végétale, a accepté de présider ce Jury.

Que Monsieur le Professeur R. ULRICH, qui a bien voulu lire et critiquer ce travail malgré ses nombreuses préoccupations, soit aussi vivement remercié.

Que Monsieur le Professeur C. BARON, qui fut mon maître en Biochimie, soit également remercié d'avoir accepté de faire partie de ce Jury.

Enfin, je tiens à exprimer tous mes remerciements à mes collègues et amis du laboratoire et, plus spécialement à Monsieur E. PERDRIZET qui m'a initié au travail de recherche, à Messieurs J. PREVOST, G. VANSUYT et R. VERNOY pour leur excellente collaboration technique et pour l'ambiance de cordiale sympathie qu'ils ont contribué à faire régner.

INTRODUCTION

Le fonctionnement d'une cellule est dirigé par les macromolécules acides nucléiques et protéines, qui donnent et transmettent des informations, d'une part, et, participent à la réalisation des ordres qui en découlent d'autre part. Cependant les petites molécules jouent dans l'accomplissement de ces ordres un rôle capital en tant qu'éventuel inhibiteur ou activateur, tout en étant les précurseurs de ces grosses molécules. La proline, par exemple, peut être son propre régulateur de synthèse mais il existe des mutants d'Escherichia coli où cet acide aminé ne peut plus assurer cette fonction, d'où un déréglement profond de la cellule : la proline synthétisée en permanence et secrétée dans le milieu extérieur provoque la biosynthèse des enzymes responsables de sa dégradation (CONDAMINE, 1971).

Pour le Physiopathologiste qui étudie les changements provoqués par l'introduction d'un agent pathogène dans la cellule, les variations de teneur de certains métabolites peuvent être le reflet d'un arrêt de transmission de certaines informations ou de la réalisation d'ordres différents induits par l'agent qui perturbe ainsi l'équilibre premier de la cellule. En outre, ces perturbations provoquées par l'agent pathogène peuvent avoir des incidences diverses suivant l'état cellulaire au moment de l'infection.

Aborder l'étude d'un phénomène biologique par la recherche des changements au niveau des métabolites intermédiaires est aujourd'hui une méthode de travail très utilisée. Si les renseignements apportés par cette méthode sont malgré tout difficiles à interpréter du fait de notre ignorance, ils permettent de passer au niveau plus élevé c'est-à-dire macromoléculaire, d'une façon plus précise.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549828_0005

C'est dans cette optique que nous avons abordé le travail qui fait l'objet de cette thèse. Divers faits expérimentaux distincts les uns des autres, en relation soit avec la résistance à la multiplication d'un virus, soit avec le stade de développement de la plante nous ont amené à étudier certaines déviations métaboliques liées à ces phénomènes.

PERDRIZET (1963-1965) a montré au cours d'une longue étude sur certains végétaux présentant des "jaunisses" virales ou génétiques que les symptômes de déficiences chlorophylliennes s'accompagnent souvent d'une perturbation précoce et importante du métabolisme de divers acides aminés libres dont la proline. Il a semblé intéressant, à ce moment, de rechercher ce phénomène en utilisant des souches de virus qui altèrent profondément la synthèse chlorophyllienne : notre choix s'est porté sur la souche "Aucuba" du virus de la mosaïque du tabac, virus plus facile à étudier que les virus de type "jaunisse".

C'est au cours des premiers essais dans ce domaine que nous avons remarqué l'accumulation considérable de proline libre chez les tabacs présentant leurs premières ébauches florales, alors que les plantes élevées dans des conditions identiques, mais prélevées à l'état végétatif ne contiennent que de faibles quantités de cet acide aminé.

D'autre part, MARTIN et GALLET (1966, b) étudiant l'influence de la température, par des passages alternatifs à 20°C et à 32°C, sur la réaction d'hypersensibilité, c'est-à-dire sur la formation, autour du point d'inoculation, de petites lésions locales nécrotiques qui précèdent un arrêt de la synthèse virale protégeant la plante d'une généralisation du parasite grave de conséquences, ont montré qu'un séjour à 32°C inhibe la floraison en même temps que la réaction hypersensible, permettant ainsi au virus de se généraliser dans la plante hôte. Ils ont de plus montré (1966, a,b, c) que l'arrêt de la multiplication du virus à 20°C n'est pas dû, comme on le croyait antérieurement, à la formation d'une barrière de cellules mortes, mais bien à un arrêt des processus qui conduisent la cellule vivante

à produire de nouveaux virions : en plaçant les plantes à 32°C, on lève ce pouvoir inhibiteur de multiplication virale.

On sait parallèlement, qu'en général, les végétaux présentent une certaine résistance à la multiplication virale lorsqu'ils sont passés à l'état de reproduction. GRISON et MARTIN (1961) en greffant un hôte hypersensible (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. ou *Nicotiana glutinosa*) sur un hôte sensible (*Nicotiana tabacum* var. Samsun) au virus de la mosaïque du tabac et en inoculant une feuille du porte greffe, ont montré qu'il y avait généralisation du virus dans le greffon, donc sa destruction, uniquement si celui-ci est à l'état végétatif ; si le greffon est à l'état floral ou plus précisément si l'induction florale est déclenchée, le virus se multiplie moins et le greffon reste sain en apparence et fleurit normalement.

Des expériences semblables, effectuées non plus sur des tabacs indifférents mais sur des tabacs photopériodiques, ont donné des résultats identiques : si on greffe *Nicotiana sylvestris*, plante de jours longs absolu, sur *Nicotiana tabacum* var. Samsun, après inoculation du porte greffe avec la souche "Aucuba" du virus de la mosaïque du tabac, en jours longs, on a nécrose du greffon tant que celui-ci est à l'état végétatif, c'est-à-dire en rosette. Dès que l'induction florale est déclenchée, on a allongement des entre noeuds et le greffon reste sain en apparence. Par contre, en jours courts, le greffon reste végétatif et, dans ces conditions, on a destruction de celui-ci, après inoculation du porte greffe, quel que soit son âge.

Ainsi donc l'influence du stade de développement de la plante hôte sur l'évolution de la maladie permet de penser qu'il existe une ou plusieurs relations entre les mécanismes de multiplication virale et les processus physiologiques de la mise à fleurs.

Connaissant, par ailleurs, l'importance de l'accumulation de certains acides aminés et, en particulier de la proline, dans certaines maladies virales d'une part, au cours du développement de la plante d'autre part, il nous a semblé important de rechercher s'il existe une relation entre ces processus biochimiques et les mécanismes physiologiques où ils paraissent intervenir.

Ce sont ces diverses raisons qui nous ont incités à entreprendre une étude du métabolisme de certains acides aminés libres dont la proline, en fonction de l'âge et du développement de la plante ainsi que des conditions externes qui influencent ces mécanismes.

Tous nos essais se sont limités jusqu'à présent aux plantes saines, mais nous avons gardé à l'esprit les causes initiales qui nous ont poussés à l'entreprendre, même si, par moment, nous nous en sommes largement écartés. Nous tenons, en effet, à attirer l'attention sur le fait que ce travail sur les acides aminés avait pour objectif beaucoup plus l'étude des mécanismes de la résistance à la multiplication virale que l'étude de l'induction florale. Cependant la connaissance du comportement de la proline dans les plantes saines était une condition préalable et indispensable à une telle étude.

∿∿∿

MATERIEL ET TECHNIQUES

A - LE MATERIEL VEGETAL

Les expériences ont été effectuées principalement sur *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. Cependant cette plante étant indifférente à la photopériode ou plus exactement "préférante" de jours longs, nous avons cherché à déterminer si les résultats pouvaient être étendus à des plantes de photopériodisme absolu ; nous nous sommes adressés à *Nicotiana sylvestris*, tabac de jours longs. Mais si les exigences photopériodiques de ces deux tabacs sont différentes, il en est de même de leur réaction vis-à-vis de la température : MARTIN et GALLET (1966) ont montré, en effet, que divers *Nicotiana* dont le *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. placés en salle climatisée à 30-32°C, avant leur induction florale, restent végétatifs aussi longtemps qu'ils sont maintenus à cette température, alors que les témoins restés à 20°C fleurissent normalement (Photo n°1).

Placés à 32°C, alors que les ébauches florales sont formées, ils fleurissent, mais on a rapidement "un retour à l'état végétatif" à partir d'un bourgeon situé à l'aisselle d'une des dernières bractées (Photo n°2) : on peut même obtenir le développement d'un bourgeon végétatif dans l'inflorescence même, si on prend soin d'enlever au fur et à mesure de leur apparition, les bourgeons axillaires apparaissant à l'aisselle des bractées. Par contre, si à 20°C on provoque le départ de ces mêmes bourgeons, en supprimant les boutons floraux, on obtient rapidement de nouvelles inflorescences.

PHOTO N° 1 : *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c.
a) élevé à 20°C : floraison.
b) élevé à 32°C : reste à l'état végétatif.

PHOTO N° 2 : *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c., élevé à 20°C et transféré à 32°C après l'induction florale.

Lorsque *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n. c. est passé à 32°C aussitôt après l'induction florale, l'inflorescence obtenue est anormale : les fleurs sont stériles. Si le passage à cette température est effectué quand les boutons floraux sont formés, l'inflorescence, dans ce cas, est normale. Il apparait que ce sont essentiellement les étamines qui sont touchées par le passage à cette température. Ce type de stérilité mâle par actions de hautes températures n'est pas propre au règne végétal. DAVID, ARENS et COHET en 1971 ont obtenu des cas semblables de stérilité chez la Drosophile ; les températures élevées provoquent un arrôt de la spermiogénèse.

Nicotiana sylvestris, au contraire, est beaucoup moins sensible à l'action de ces températures : un passage à 30-32°C, sous une photopériode favorable, retarde la floraison mais ne l'inhibe pas. On peut pourtant se demander si une température supérieure à 32°C ne provoquerait pas une réponse analogue à celle obtenue sur *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n. c.

Cependant il faut préciser que ces observations ont été faites dans des conditions expérimentales précises ; il est certain que l'on ne peut dissocier l'action de la température des autres facteurs du milieu à savoir, l'éclairement, l'humidité relative...

Sur *Nicotiana tabacum*, il est possible, en dehors de l'examen direct, de noter approximativement le moment de la transformation du méristème végétatif en méristème floral ; dès ce moment, le limbe des jeunes feuilles devient de plus en plus pointu, c'est-à-dire bractéiforme. Ceci a lieu dans les salles climatisées à 20°C, aux alentours du 65ème jour.

- Les acides aminés libres du tabac, leur teneur, leurs variations avec l'âge ont été largement étudiés par NOGUCHI et ses collaborateurs, mais il s'agit surtout des acides aminés de feuilles dont la croissance est terminée, de feuilles assez éloignées de l'apex.

Dès 1961, cette équipe a commencé son travail en déterminant la composition en acides aminés de la sève de *Nicotiana tabacum* var. Bright yellow (NOGUCHI, YAMAMOTO et TAMAKI). Ce sont les amides et surtout la glutamine qui prédominent ; viennent ensuite la lysine, la leucine... la proline n'a pas été détectée.

A partir de 1962, ces auteurs ont étudié les acides aminés des feuilles ; NOGUCHI et TAMAKI ont, en particulier, analysé les variations de ces composés au cours de la journée. Dans les feuilles, on trouve, par ordre d'importance, les acides glutamique et aspartique, les amides, puis la sérine, l'alanine et la thréonine ainsi que la proline et l'acide γ amino butyrique.

Nos résultats, nous le verrons plus loin, confirment ceux-ci, sauf pour la proline où le contenu varie dans les feuilles du sommet suivant le stade de développement.

Selon ces auteurs le contenu en divers acides aminés varie suivant l'heure de la journée, mais ils sont en quantité plus importante durant la période lumineuse.

Des essais en fonction de l'âge de la feuille (NOGUCHI, YAMAMOTO et TAMAKI, 1964) indiquent que la teneur de la plupart des acides aminés diminue quand l'âge de la feuille augmente.

A l'aide de précurseurs radioactifs (acide glutamique ^{14}C et proline ^{14}C) MIZUSAKI, NOGUCHI et TAMAKI en 1964 ont montré que la biosynthèse de la proline est active le jour et très lente la nuit. La lumière doit donc jouer un rôle important dans sa synthèse. Par contre, son oxydation a lieu le jour comme la nuit sans différence d'intensité.

En 1966, NOGUCHI, KOIWAI et TAMAKI ont étudié l'activité de la pyrroline 5 carboxylate réductase, enzyme qui permet la transformation de l'acide pyrroline carboxylique en proline.

Sur le schéma n°1, nous avons représenté la chaine biosynthétique de la proline à partir de l'acide glutamique telle qu'elle a été démontrée aussi bien chez les micro organismes que chez les animaux et les végétaux.

B - CONDITIONS EXPERIMENTALES

Pour tous les essais, les plantes, après semis en serre, sont transférées en salles climatisées à 20°C ou 32°C (température réglée à $\pm$ 1°C). Hormis les expériences faites sur tabacs photopériodiques, ces salles sont sous une photopériode de 16 heures, avec un éclairement de 8000 lux ou de 12000 lux en moyenne au niveau des plantes et une humidité relative de 70 %.

Les expériences les plus récentes, réalisées dans les nouvelles salles sous 12000 lux, nous ont montré qu'il serait nécessaire de faire des essais plus précis afin de déterminer la température exacte de réversion de l'induction florale du tabac ; en première approximation, celle-ci semble voisine de 32°C ($\pm$ 1°C), mais la qualité de la lumière ainsi que sa quantité paraissent également des facteurs importants ; on a pu constater qu'à une augmentation de l'éclairement, il était nécessaire d'apporter une augmentation de la température pour avoir le même phénomène d'inhibition de floraison. Cette observation mériterait d'être approfondie.

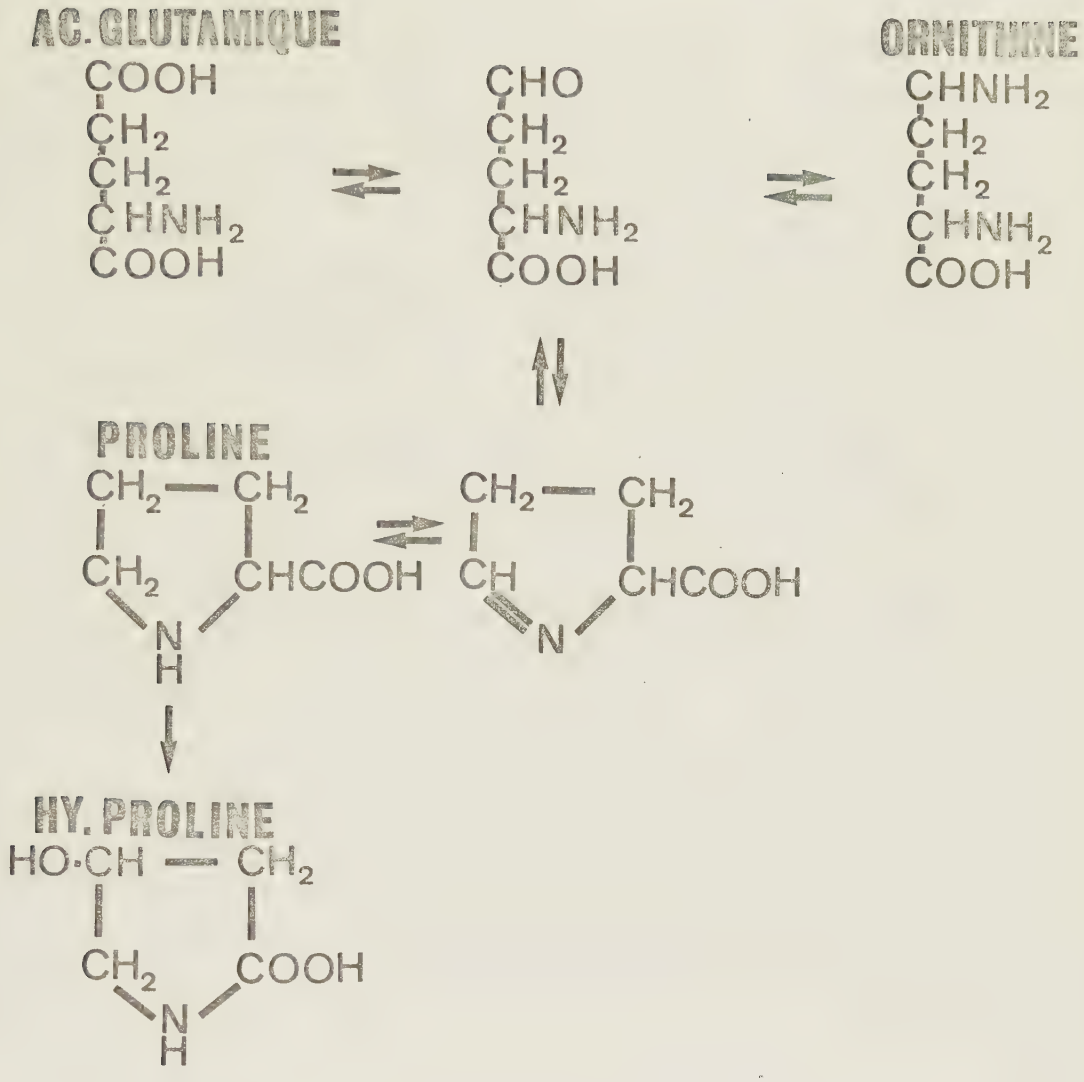


Schéma I : Synthèse de la proline à partir de l'acide glutamique.

- Conditions de culture :

Les tabacs, après semis, sont repiqués en terrines au stade cotylédons. Ils sont ensuite mis en pots sur un mélange tourbe-gravier au stade deux à trois feuilles. Les plantes reçoivent chaque jour une solution nutritive (KNOP + oligoéléments).

En dehors de certaines conditions particulières à chaque expérience, qui seront décrites avec les résultats, nous avons toujours effectué les prélèvements :

- soit sur des plantes élevées en permanence à 20°C ou à 32°C, et sur des plantes élevées à 20°C puis placées à 32°C un certain nombre de jours avant l'analyse (schéma n°2).

- soit sur des plantes élevées en jours longs, et des plantes élevées en jours longs, placées en jours courts un certain nombre de jours avant le prélèvement.

Les dosages, sauf ceux effectués sur des tissus plus particuliers (boutons floraux, par exemple) ont porté sur le sommet de la plante, c'est-à-dire sur le bourgeon terminal, végétatif ou inflorescentiel, avec les jeunes feuilles qui l'accompagnent ainsi qu'une ou deux feuilles ayant cessé leur croissance (Photo n°3).

Sauf les expériences réalisées en fonction de la période lumineuse, les prélèvements ont toujours été réalisés à la même heure.

Toutes les expériences ont été répétées au minimum deux fois.

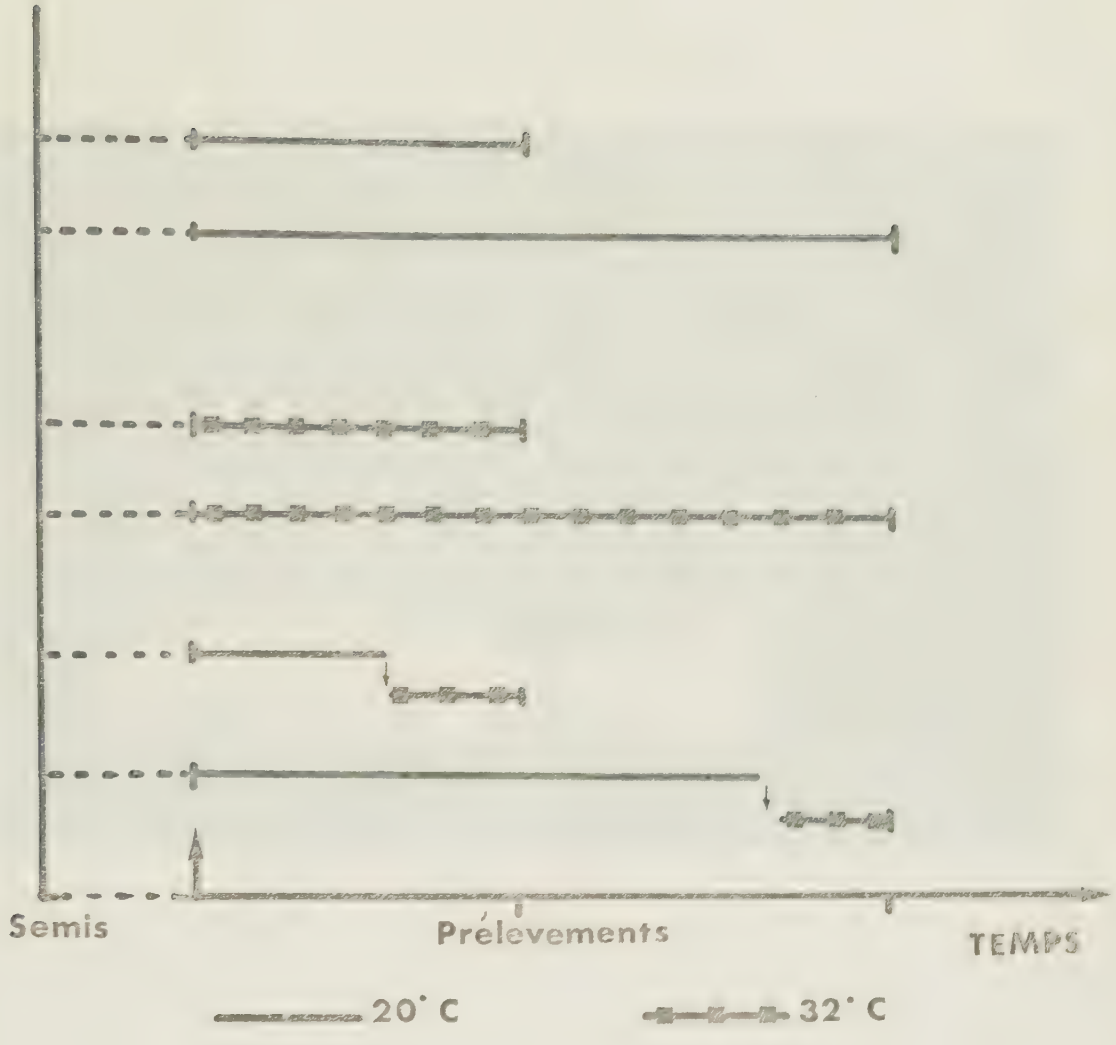


Schéma 2 : Conditions expérimentales de prélèvements des Nicotiana tabacum var. Xanthi n. c.

PHOTO N° 3 : "Sommets" de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. utilisés pour les analyses.

C - TECHNIQUES D'EXTRACTION ET DE DOSAGE

1 - Extraction et purification

a) Les acides aminés (Figure n°1). Les tissus frais, après pesée, sont broyés dans l'alcool à 97° ; le broyat obtenu est centrifugé à 4000 g pendant 20 min.Le culot est repris plusieurs fois par des solutions alcooliques de plus en plus diluées (97°, 60°, 20° et eau) et centrifugé de la même manière à 4000 g.

Dans les expériences comportant des dosages sur les acides aminés protéiques qui restent en totalité dans le culot, on évite de laver ce culot avec des solutions alcooliques de titre inférieur à 70°, ceci afin d'éviter une solubilisation partielle de certaines protéines.

Les surnageants réunis sont délipidés par addition d'un volume égal de chloroforme. Les acides aminés libres contenus dans la phase aqueuse, préalablement débarrassée de l'alcool et du chloroforme résiduels au moyen d'un évaporateur rotatif, sont séparés des autres substances hydrophiles, essentiellement des sucres et des acides organiques, par passage sur résines échangeuses d'ions (Permutite 50, forme H+) selon la technique de BISERTE et BOULANGER (1950). Retenus par cette résine, ils en sont élués à l'aide d'ammoniaque normale. Le résidu concentré à sec est repris dans un tampon citrate à pH 2,5, correspondant au pH initial du tampon de séparation sur l'autoanalyseur.

Pour les acides aminés protéiques, après lavage par des solutions alcooliques dont le titre ne descend pas en dessous de 70°, le culot contenant les protéines est hydrolysé au moyen d'acide chlorhydrique 6N dans des ballons à reflux pendant 24 heures, à 120°C.

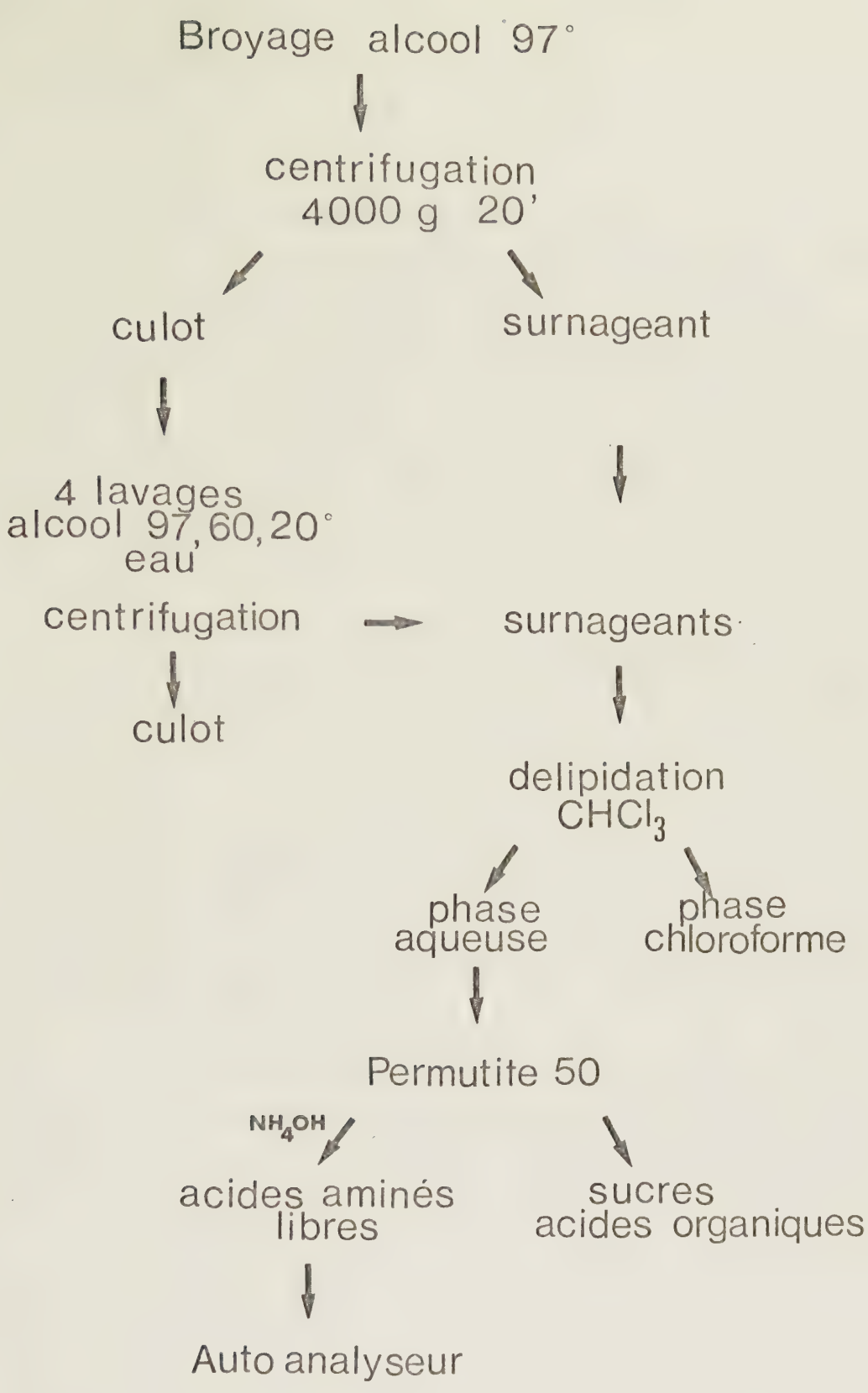


Fig. I : Procédé d'extraction et de purification des acides aminés libres.

Cette technique d'hydrolyse détruisant, en partie ou en totalité, certains acides aminés, nous avons établi pour chaque acide aminé le pourcentage détruit après 24, 48 et 72 heures d'hydrolyse de solution d'acides aminés de référence. Les résultats sont indiqués par le tableau n°1 : il apparaît qu'en dehors des acides aminés soufrés, cystéine et méthionine, ainsi que du tryptophane, les autres acides aminés sont peu touchés après 24 heures d'hydrolyse dans de telles conditions ; nous avons donc gardé ce temps pour toutes nos expériences.

Les échantillons après ce temps d'hydrolyse, sont concentrés à sec, repris par l'eau et reconcentrés plusieurs fois afin d'éliminer l'acide chlorhydrique, puis repris dans le tampon citrate à pH 2,5.

b) Les protéines : Pour certaines expériences, nous avons été amenés à doser les protéines solubles de feuilles de tabacs placés dans diverses conditions. Dans ce but nous avons utilisé une technique d'extraction dérivée de la technique de STAPLES et STAHMANN (1964).

Les tissus sont broyés au mortier à 2°C dans un tampon Tris, O, 1M (pH 8) contenant 0,6M de saccharose et 0,2 % de mercaptoéthanol. Le broyat est centrifugé 15 min. à 10 000 g., Pour éliminer les débris cellulaires, puis à 48 000 g pendant 45 min.

Le culot est lavé trois fois avec le même tampon et recentrifugé de la même manière. Les différents surnageants réunis sont traités par l'acide trichloracétique pour arriver à une concentration finale de 5 %. Les protéines précipitées, centrifugées à 10 000 g, 15 min., lavées par un mélange alcool-éther, sont redissoutes dans la soude 0,1 N et conservées en vue de leur dosage.

	24 heures	48 heures	72 heures
Ac. aspartique	0	0	0
Thréonine	2 à 3	3	4
Sérine	8	11	15
Ac. glutamique	0	0	0
Proline	0	0	0
Glycocolle	0	0	0
Alanine	0	0	0
Valine	0	0	0
Cystine	90	100	100
Méthionine	50	90	99
Isoleucine	0	0	0
Leucine	0	0	0
Tyrosine	5	15	20
Phenylalanine	0	2	4
Lysine	0	0	0
Histidine	0	0	0
Tryptophane	95	100	100
Arginine	0	0	0

Tableau n° 1 : Pourcentage de chaque acide aminé détruit après hydrolyse acide (HCl 6N) en tube à reflux durant 24, 48 ou 72 heures.

Pour étudier la répartition de la radioactivité dans les diverses protéines solubles, après séparation sur gel de polyacrylamide, nous avons utilisé le tampon d'extraction de MAY, GILLILAND et SYMONS (1970), (tampon Tris-HCl 50 mM à ph. 8,5, 90 mM de mercaptoéthanol, 5 mM SO_4 Mg et 0,1M de NH_4 Cl.

Après broyage et centrifugation (48 000 g), durant 45 min. on dépose sur le gel d'electrophorèse 50 µl de la solution de protéines à séparer.

Séparation électrophorétique des protéines solubles

Elle a été effectuée selon la technique d'ORNSTEIN (1964) et de DAVIS (1964) sur gel de polyacrylamide à 10 %. Le tampon de séparation est un tampon Tris-glycine, 0,01 M à ph. 8,3. Les gels, coulés dans des tubes en verre calibrés (70 x 6 mm.) sont constitués d'un gel intermédiaire à pores larges sur lequel on dépose la solution de protéines ; ce gel joue le rôle de tamis moléculaire. Pendant la traversée de ce gel (5 mm.) par les protéines, repérées par l'adjonction de quelques gouttes d'une solution de bleu de Bromophénol à 1 p. 1 000, le courant fourni est de 2 mA par tube. La séparation des protéines sur le gel à 10 % (60 mm.) est effectuée sous une intensité de 4 mA par tube.

A la fin de la séparation, les gels retirés de leur tube sont colorés par le Noir amido (2 % dans une solution d'acide acétique à 7 %). La fixation du colorant dure 1 heure, puis l'excès de Noir amido est éliminé par électrophorèse. Il est alors possible d'effectuer un enregistrement densitométrique.

2 - Dosages

a) Les acides aminés libres et protéiques sont estimés quantitativement au moyen d'un autoanalyseur Technicon, basé sur la méthode de STEIN et MOORE (1951 et 1954). Deux types d'appareils ont été utilisés : l'un effectuant les analyses en 22 heures, la colonne de séparation contenant une résine cationique (chromobeads A), l'autre en 6 heures (chromobeads C_2).

La révélation des acides aminés se fait avec une solution de ninhydrine et d'hydrindantine dans du méthyl-cellosolve tamponné à ph. 5,51.

A chaque analyse, on contrôle la qualité de la coloration en introduisant en même temps que l'échantillon, 0,25 micromole de Nor leucine, acide aminé non rencontré chez les végétaux.

Pour évaluer les teneurs en asparagine et en glutamine, les amides n'étant pas séparées par cette technique chromatographique, une fraction aliquote de la solution d'acides aminés est soumise à une hydrolyse ménagée par l'acide chlorhydrique 2N au bain-marie pendant trois heures. Neutralisée par la soude 2N, puis analysée à l'autoanalyseur, on obtient la valeur des deux amides, par différence des valeurs obtenues pour les acides aspartique et glutamique dans les deux analyses. L'ordre d'élution des divers acides aminés est donné par la figure n° 2.

b) Les protéines sont dosées selon la méthode de LOWRY (1951). On utilise trois solutions de réactifs :
La solution A comprend :

- 20 g de carbonate de sodium anhydre
- 0,2 g de tartrate double de sodium et de potassium
- compléter à 1 litre avec la soude 0,1 N.

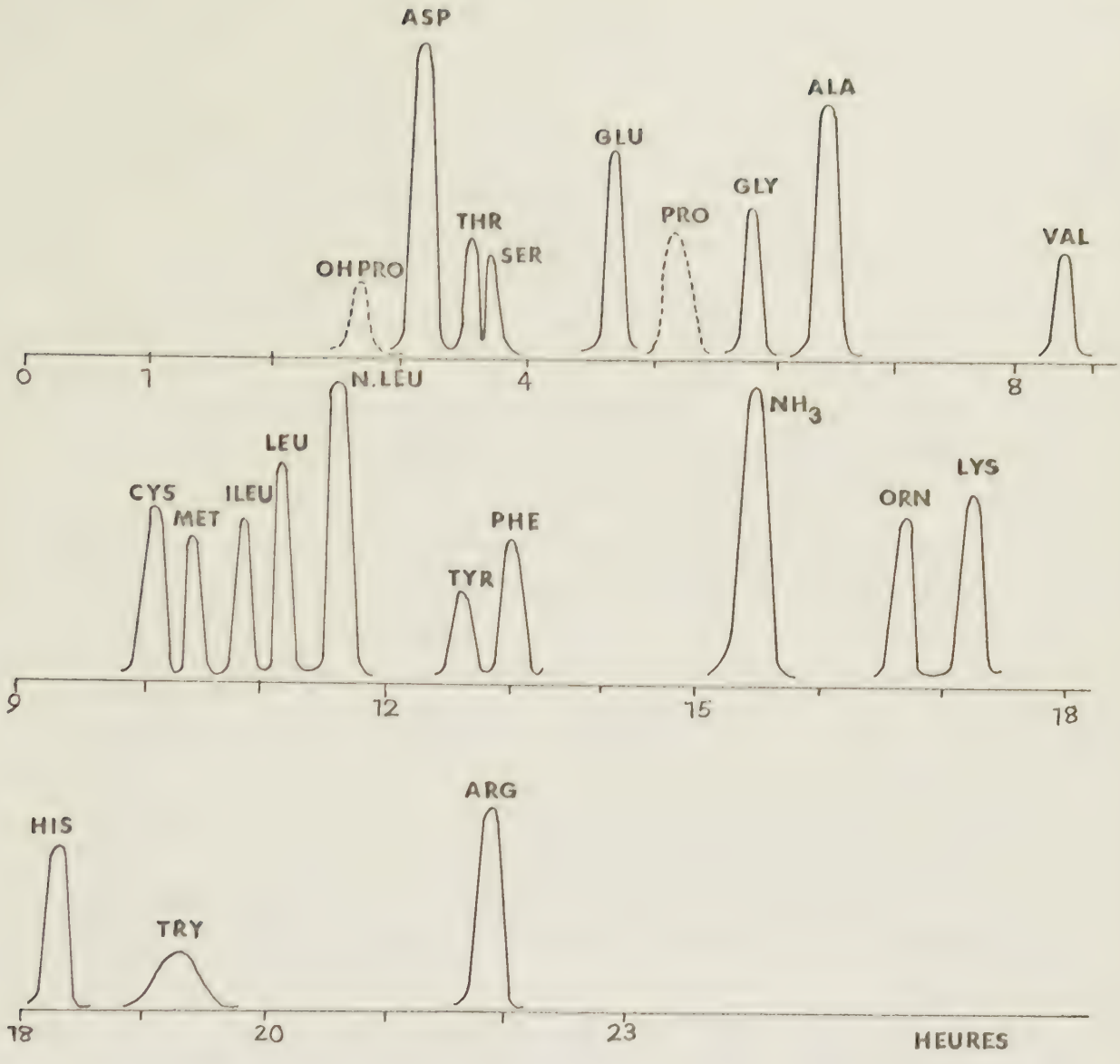


Fig. 2 : Diagramme d'élution des divers acides aminés sur colonne Technicon.

La solution B comprend :

- 0,5 g de sulfate de cuivre
- 1 goutte d'acide sulfurique
- compléter à 100 ml avec de l'eau

La solution C est la solution normale de FOLIN.

Le mélange réactionnel comprend :

- 1 ml de l'échantillon ou 1 ml de soude pour le témoin
- 3 ml du mélange A + B (50 ml A + 1ml B)

On attend 10 minutes et on ajoute 0,3 ml du réactif de FOLIN. Après 30 minutes, on fait la lecture au spectrophotomètre SAFAS à 750 n. dans l'infrarouge.

La courbe étalon (figure n°3) est effectuée sur des solutions standard d'ovalbumine cristallisée.

Afin d'éliminer les erreurs de dosage dues à la présence de phénols, on traite une fraction aliquote de la solution de protéines par du charbon végétal. Cependant il est apparu qu'une petite fraction des protéines est aussi adsorbée sur le charbon.

c) Les dosages d'azote sont faits par la méthode de KJELDAHL. Les échantillons, séchés à l'étuve à vide sont minéralisés à l'aide du catalyseur de DUMAZERT et MARCELET. Le standard utilisé est l'urée.

3 - Utilisation d'éléments radioactifs

Toutes les expériences ont été faites avec des éléments uniformément marqués (U) au ^{14}C dont la pureté est vérifiée avant chaque essai par chromatographie sur papier suivie d'autoradiographie.

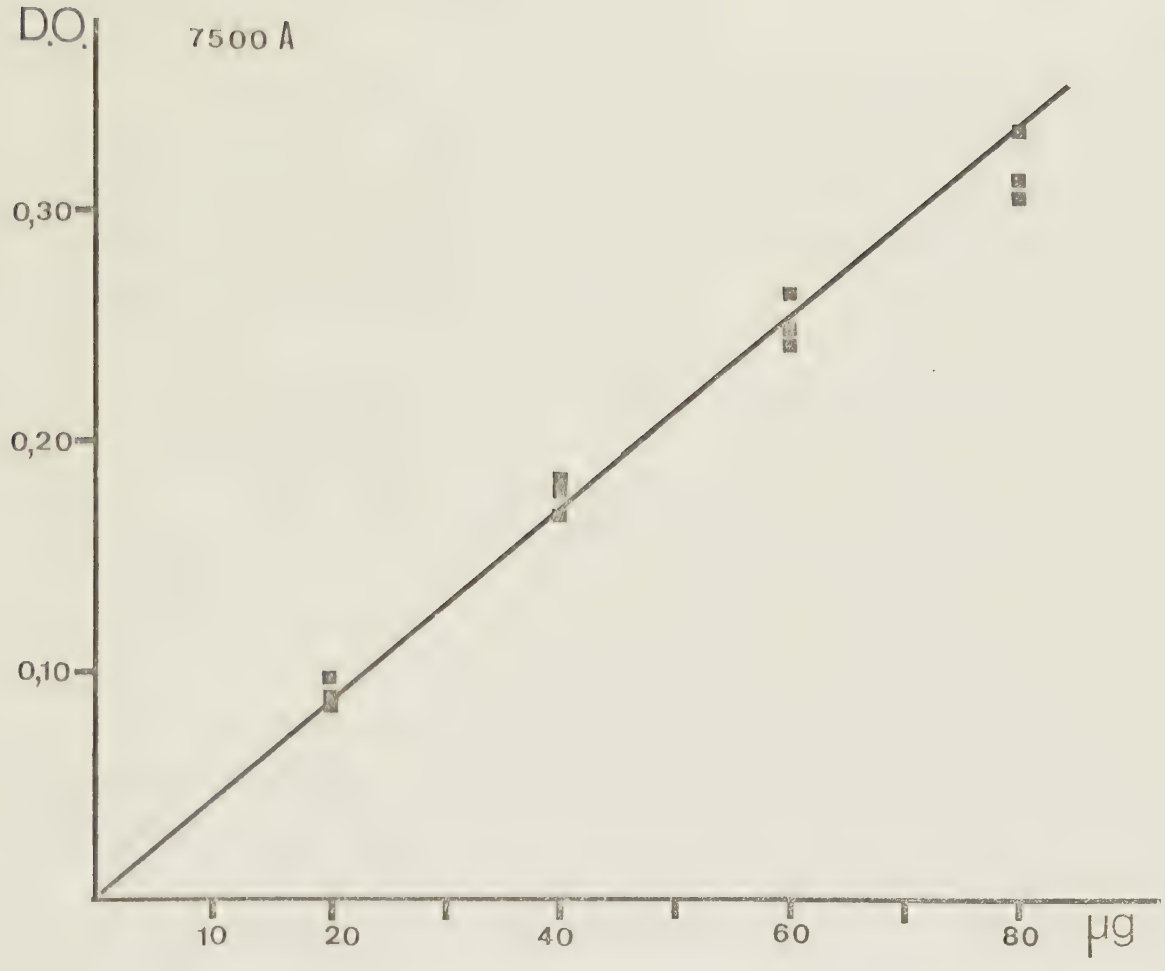


Fig. 3 : Dosage des protéines par la méthode de LOWRY.

Courbe standard obtenue avec l'ovalbumine cristallisée.

Les techniques d'extraction sont semblables aux techniques précédemment décrites, les solutions alcooliques de lavage ne descendant pas en dessous de 70 %.

Par contre, les échantillons d'acides aminés, ne sont pas repris dans le tampon citrate, mais dans l'eau distillée afin de permettre la séparation par chromatographie sur papier. Par la suite, après concentration à sec, ils sont repris dans le tampon citrate et analysés comme précédemment.

La chromatographie est faite sur du papier WATHMANN n°1 en deux dimensions.

Les solutions de développement sont :

- 1ère dimension Butanol-acide acétique-eau (BAE-4-1-2), 16 heures
- 2ème dimension Phénol-eau (4-1), 14 heures.

Après séchage, les chromatogrammes sont placés sur film Kodirex. Les taches radioactives, après révélation du film, sont repérées sur le chromatogramme et comptées au compteur Tracerlab.

Les autres fractions, c'est-à-dire les sucres et les acides organiques ainsi que la phase chloroforme, sont comptées sur coupelle.

Les acides aminés sont révélés sur le chromatogramme, par aspersion d'une solution de ninhydrine à 2 % dans l'éthanol et passage à l'étuve à 95°C.

La répartition des principaux acides aminés est donnée par la figure n°4.

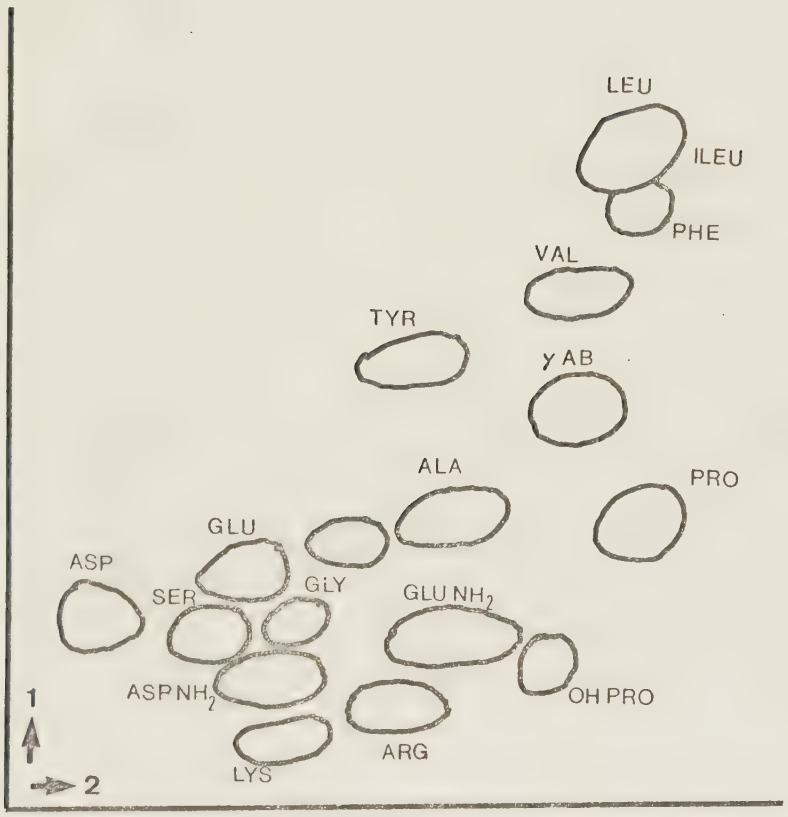


Fig. 4 : Chromatographie bidimensionnelle d'un mélange d'acides aminés.

ALA	Alanine	ILEU	Isoleucine
ARG	Arginine	LEU	Leucine
ASP	Ac. Aspartique	LYS	Lysine
ASP-NH_2	Asparagine	OHPRO	Hydroxyproline
γ AB	Ac. γ amino butyrique	PRO	Proline
		SER	Serine
GLU	Ac. Glutamique	THR	Threonine
GLU-NH_2	Glutamine	TYR	Tyrosine
GLY	Glycocolle	VAL	Valine

L'élément radioactif est fourni à des sommets de plantes, l'extrémité basale de la tige trempant dans un tube contenant la solution radioactive. Toutes les manipulations sont réalisées dans des boites à gants équipées d'un dispositif d'absorption du CO_2. On prend soin de fournir de l'eau dès que la solution est absorbée.

Les temps de métabolisme ont été de 6 heures pour tous les éléments donnés sauf pour l'acide glutamique (5 heures).

Eléments radioactifs utilisés

L-Proline ^{14}C, (U)	activité spécifique	: 101 mCi/mM
L-Ac. glutamique ^{14}C, (U)	" "	: 110 mCi/mM
L-Arginine ^{14}C, (U)	" "	: 120 mCi/mM
L-Leucine ^{14}C, (U)	" "	: 130 mCi/mM

a) Détermination de la radioactivité des protéines après séparation électrophorétique (GIANINAZZI, 1970)

Pour ce travail, on découpe les gels d'électrophorèse en petits cylindres de 1,5 mm ; chaque fragment, placé dans un tube à scintillation, est hydrolysé par l'eau oxygénée à 50°C. On ajoute ensuite 1 ml d'hydroxyde d'hyamine, puis 10 ml d'un mélange scintillant :

- 5 g de PPO
- 0,3 g de dimethyl POPOP
- 1 litre de toluène

La radioactivité est déterminée au compteur à scintillation PACKARD (TRICARB 3380)

b) Répartition des éléments radioactifs dans les feuilles de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c.

Afin de déterminer si les éléments radioactifs (Proline ^{14}C) se répartissent de la même manière dans les feuilles quel que soit le stade ou l'âge de la plante, après absorption de l'élément (5 à 10 µCi), on fait une autoradiographie des feuilles.

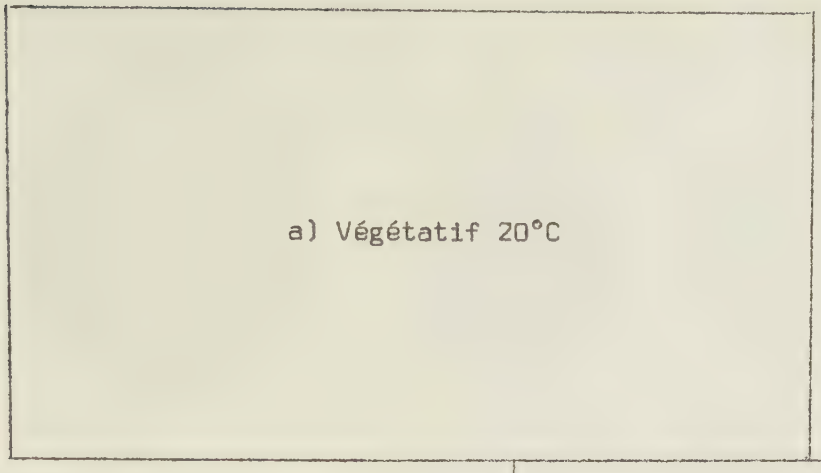
Les feuilles sont fixées à -15°C entre deux plaques de verre et placées sur autoradiogramme (film Kodirex) pendant 15 à 20 heures.

Sur la photo n° 4, nous avons une idée de la répartition de la radioactivité dans les feuilles de plantes végétatives ou florales à 20°C ou après transfert à 32°C.

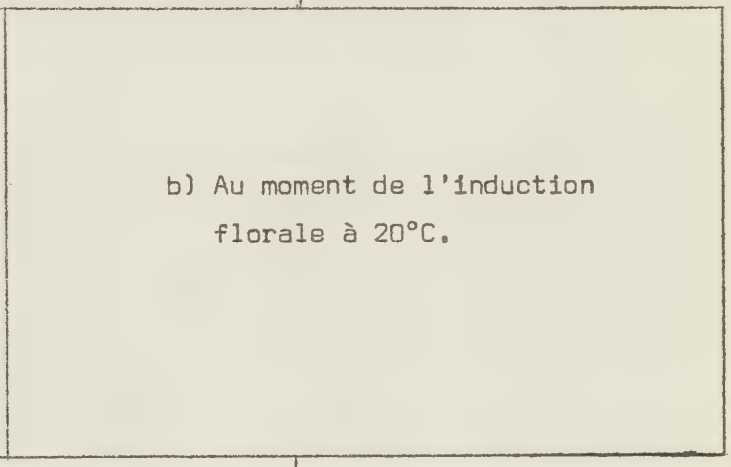
Quel que soit le stade et la température, il y a une relative homogénéité de répartition. Cependant l'image est un peu différente suivant le stade. Les nervures principales et secondaires sont plus radioactives dans les plantes florales et ceci dès l'induction florale (65 jours) que dans les plantes végétatives.
On a l'impression que l'élément a des difficultés à quitter les vaisseaux pour pénétrer dans le parenchyme. Après transfert à 32°C, au contraire, l'élément radioactif a quitté les nervures ; ici l'appel d'eau et des solutés par les cellules paraît plus important à cette température.

Ces résultats particulièrement intéressants seraient à étudier d'une façon plus approfondie ; nous en reparlerons du reste au cours de la conclusion.

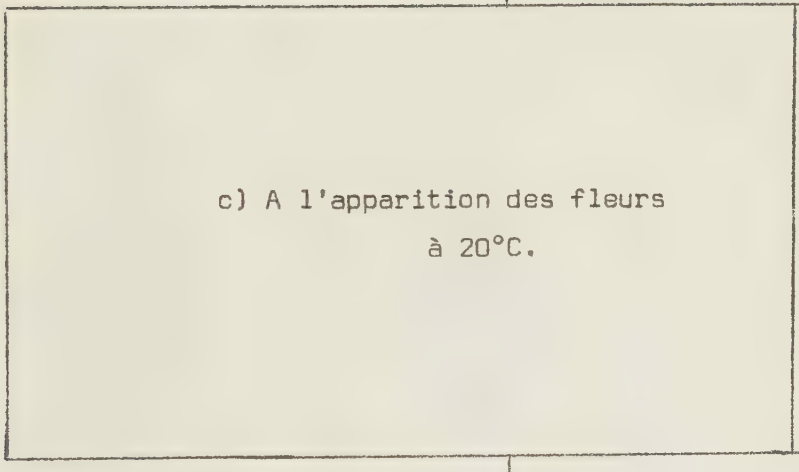
PHOTO N° 4 : Répartition de la radioactivité dans les feuilles du "sommet" de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c.



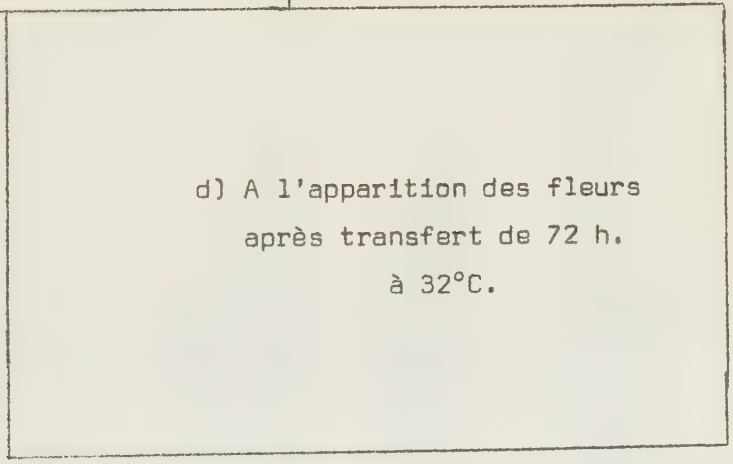
a) Végétatif 20°C



b) Au moment de l'induction florale à 20°C.



c) A l'apparition des fleurs à 20°C.



d) A l'apparition des fleurs après transfert de 72 h. à 32°C.

Voir page suivante

a
20°
58 JOURS

b
20°
65 JOURS

c
20°
88 JOURS

d
20° 72h a 32°
88 JOURS

4 - Mesure du contenu en eau des tissus et de son renouvellement

- Le poids sec est déterminé en plaçant à l'étuve à vide pendant plusieurs jours un poids déterminé de tissu frais.

- La vitesse d'absorption de l'eau : on place dans un tube un volume d'eau : on détermine la vitesse d'absorption d'une unité de volume en plaçant un "sommet" de tabac sur cette solution, la partie basale trempant dans l'eau. On peut aussi peser les tissus avant et après absorption et déterminer pendant un temps précis la quantité d'eau absorbée.

- Les mesures de transpiration sont faites en plaçant les feuilles de tabac dans des sacs en polyéthylène et en pesant après un temps déterminé (4 ou 8 heures) le poids d'eau recueilli. Ces techniques,certes rudimentaires, peuvent tout de même apporter des indications utiles sur le contenu en eau des tissus.

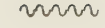
D - MODE D'EXPRESSION DES RESULTATS

Il y a plusieurs façons d'exprimer les résultats de dosages. En particulier, on peut ramener les valeurs de chaque acide aminé par rapport au poids frais ou au poids sec, mais aussi en pourcentage d'un acide aminé par rapport au total des acides aminés ou par rapport à l'azote.

Aucune n'est satisfaisante, cependant nous avons choisi d'exprimer nos résultats en micromoles d'acide aminé par gramme de tissu frais et en pourcentage.

Mais, ayant observé des différences dans les teneurs en eau des tissus, nous avons exprimé certains résultats par rapport au poids sec. Nous verrons que, quel que soit le mode d'expression utilisé, nos résultats nous permettent d'aboutir aux mêmes conclusions.

Dans les expériences à l'aide de traceurs radioactifs, nous avons retenu comme base, d'abord le nombre total de coups par minute trouvé dans les diverses fractions, ainsi que le pourcentage de radioactivité d'un métabolite donné par rapport au total de la radioactivité comptée. En effet, le poids frais de nos échantillons n'étant pas toujours le même entre tissus de plantes végétatives et tissus de plantes florales par exemple, nous avons préféré, en général, ce mode d'expression à la radioactivité spécifique.



CHAPITRE I

EVOLUTION DES TENEURS EN ACIDES AMINES EN FONCTION DU DEVELOPPEMENT ET DE LA TEMPERATURE

Dans cette première partie, nous nous sommes attachés à définir les variations de teneurs en certains acides aminés libres particulièrement en proline, en fonction du stade de développement de la plante, c'est-à-dire chez des plantes végétatives ou florales et chez des plantes séjournant en conditions favorables à l'induction florale.

A - EVOLUTION EN FONCTION DU DEVELOPPEMENT. INFLUENCE D'UN COURT PASSAGE A 32°C (VALLEE, PERDRIZET et MARTIN 1967 et 1968).

Une série de prélèvements est effectuée sur un lot de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c., placé à 20°C, depuis le stade trois feuilles entièrement développées jusqu'à la floraison. On prélève le sommet de la plante (bourgeon terminal, jeunes feuilles et dans ce cas, trois feuilles ayant cessé leur croissance).

Afin d'étudier l'influence d'un court séjour à 32°C sur la teneur en acides aminés libres, une fraction du lot de plantes est transférée, 72 heures avant chaque prélèvement, de la chambre à 20°C dans la chambre à 32°C (voir schéma p. 14)

En conséquence, à chaque prélèvement, c'est-à-dire chaque semaine, on a extrait et analysé les acides aminés libres :

- d'un sommet de tabac ayant séjourné n + 72 heures à 20°C.
- d'un sommet de tabac ayant séjourné n heures à 20°C + 72 h. à 32°C.

Il faut signaler que la transformation du méristème végétatif en méristème inflorescentiel se situe ici entre le troisième et le quatrième prélèvement, alors que l'ébauche de l'inflorescence est visible, à l'oeil nu, à partir du septième prélèvement (boutons floraux de l'ordre du millimètre).

Les résultats de cette étude sont représentés sur la figure n° 5.

a) Pour les plantes restées n + 72 heures à 20°C, c'est-à-dire celles ayant séjourné en permanence à cette température, on note une accumulation de proline au fur et à mesure du développement de la plante et surtout à partir d'un stade voisin de l'induction florale. La teneur de cet acide aminé passe de 0,05 micromole par gramme de poids frais pendant la phase végétative à plus de I,8 micromole au moment de la floraison, ce qui représente une augmentation de l'ordre de 40 fois.

Ces premières expériences ont été faites dans les salles climatisées sous 8 000 lux d'éclairement ; avec les nouvelles salles dont l'éclairement est de l'ordre de II 000 lux à 12 000 lux, les teneurs en proline sont beaucoup plus importantes, on passe en effet de 0,12 micromole par gramme de poids frais à plus de 4 micromoles au moment de l'apparition des fleurs. Dans ces nouvelles salles, les teneurs en acides aminés libres sont plus élevées pour la plupart des acides aminés.

On note, d'autre part, une accumulation importante d'asparagine au moment de l'épanouissement des fleurs.

Certains autres acides aminés présentent des fluctuations au fur et à mesure du développement : ce sont les acides aspartique et glutamique, la glutamine, la thréonine et la sérine.

Tous les autres acides aminés ne subissent que peu de variations au cours de l'évolution de la plante.

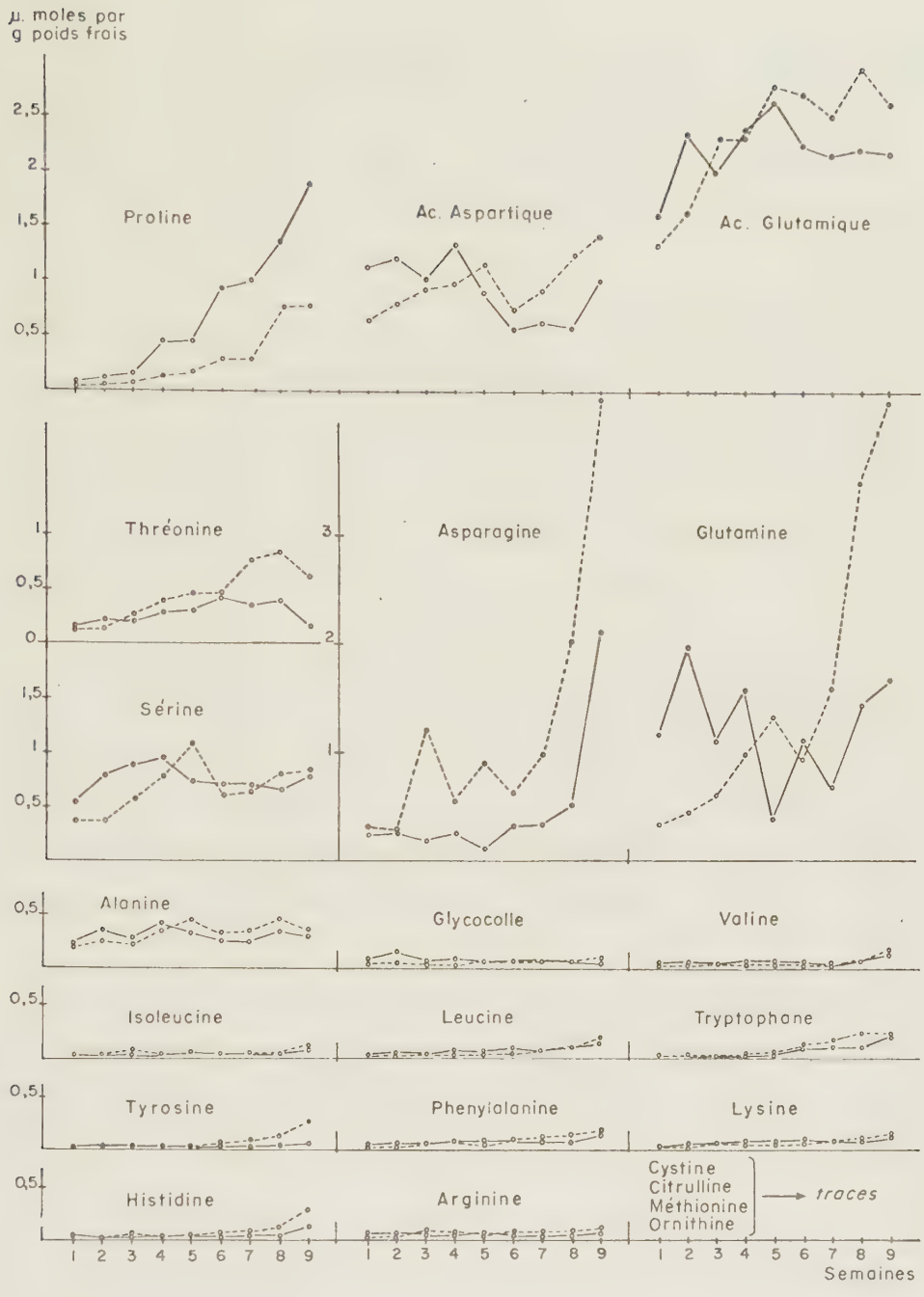


Fig. 5 : Evolution de la teneur en acides aminés libres chez Nicotiana tabacum var. Xanthi n.c. à divers stades de son développement.

——— Plantes élevées n + 72 heures à 20°C.

------ Plantes élevées n heures à 20°C + 72 heures à 32°C.

b) Pour les plantes placées n heures à 20°C, puis 72 heures à 32°C, on constate une chute spectaculaire de la teneur en proline qui passe, par exemple, de 1,85 micromole par gramme de poids frais à l'épanouissement des fleurs à moins de 0,7 micromole après 72 heures à 32°C.

Dans les expériences sous 12 000 lux d'éclairement, on passe dans les mêmes conditions de 4 micromoles à 0,5 micromole après 72 heures. Les plantes restées n heures à 20°C, présentaient avant leur passage à 32°C, la même teneur en proline que les témoins laissés à 20°C ; un court séjour de 72 heures à 32°C a donc suffi pour abaisser notablement cette teneur.

Au contraire, par rapport aux témoins restés à 20°C, on constate une accumulation, en fin de développement, des amides, asparagine et glutamine, ainsi que, dans des proportions beaucoup plus faibles, de thréonine, d'histidine, de tyrosine, de tryptophane. Comme à 20°C les autres acides amines ne présentent pas de variations au cours de l'évolution de la plante.

Tous les résultats que nous venons d'énoncer ont été exprimés en fonction du poids frais. Afin de voir si ces variations sont significatives, il est indispensable de les rapporter à d'autres paramètres.

La figure n°6 nous montre les résultats obtenus, en exprimant les variations de la proline libre en pourcentage par rapport au total des acides aminés libres. Il ressort de cette figure qu'il y a une accumulation de proline libre au fur et à mesure que se déroulent les processus physiologiques de la mise à fleurs : en outre la teneur de cet acide aminé subit une baisse importante après passage à 32°C. En effet, à 20°C le pourcentage de proline libre passe de 0,6 % à plus de 16 % à la floraison alors qu'après passage à 32°C, il retombe à une valeur voisine de 5 % chez les tabacs à fleurs.

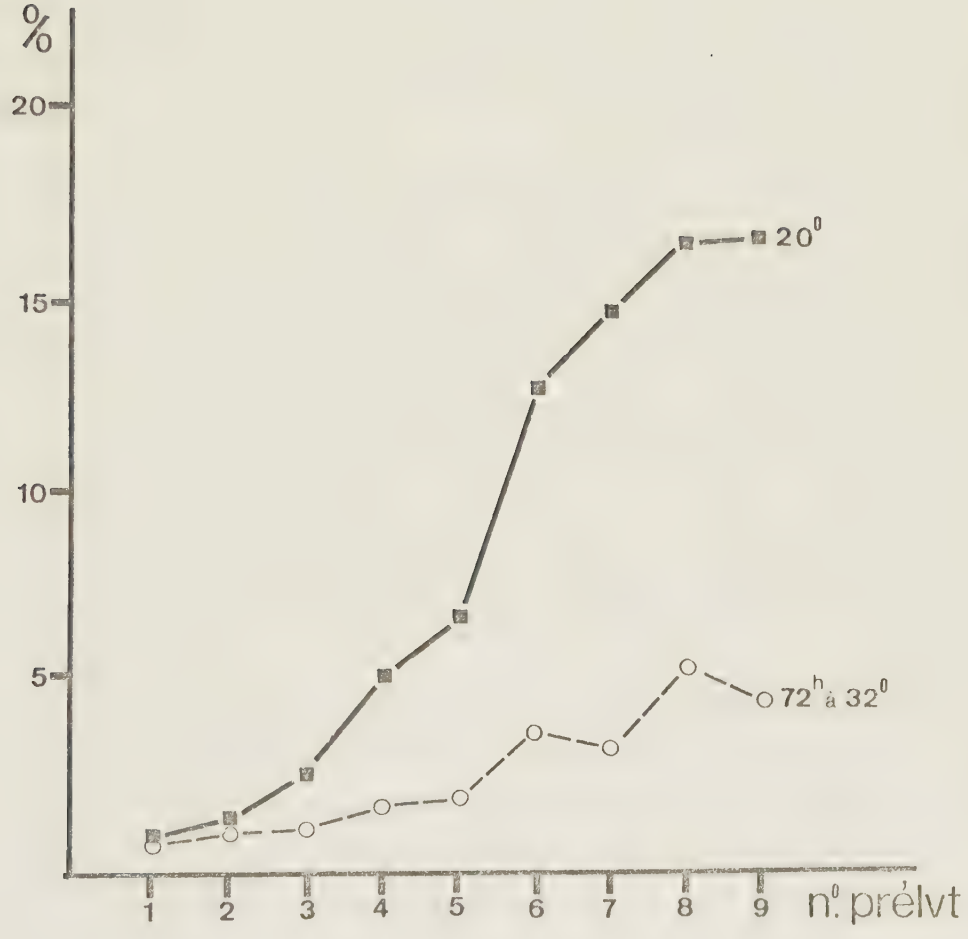


Fig. 6 : Pourcentage de proline libre par rapport au total des acides aminés libres chez Nicotiana tabacum var. Xanthi n.c.

■——■ Plantes élevées n + 72 heures à 20°C.
○---○ Plantes élevées n heures à 20°C + 72 heures à 32°C.

On peut, cependant, se demander si ces résultats gardent toute leur signification si on les ramène au poids sec des tissus ; la teneur en eau peut être très différente suivant le stade et la température.

Sur le tableau n° 2, nous avons fait figurer la teneur en micromoles de chaque acide aminé libre par rapport au gramme de poids sec d'un certain nombre de prélèvements : on retrouve à l'examen de ce tableau les mêmes variations de teneurs en acides aminés observées en fonction du stade et de la température ; elles sont seulement moins importantes du fait des variations de teneurs en eau des tissus.

Sur la figure n° 7, nous voyons, en effet, que :

- la teneur en eau des tissus de plantes élevées à 20°C diminue lorsque l'on se rapproche de la floraison.

- après 72 heures à 32°C ces mêmes tissus ont, par rapport à 20°C, une teneur en eau plus élevée.

Les tissus de plantes à "caractère végétatif" ont une teneur en eau plus importante que les tissus de "type floral".

Les dosages d'azote, selon la méthode de KJELDAHL, (figure n° 8) réalisés sur ce même matériel n'indiquent pas de variation dans le contenu en azote ramené au gramme de poids frais, mais, par contre, mettent en évidence une teneur plus élevée en azote après passage à 32°C lorsque l'on réfère au poids sec. Les tissus de tabacs soumis 72 heures à 32°C sont plus riches en azote. Nous discuterons plus loin (voir conclusion) ces résultats comparés aux travaux effectués sur des plantes soumises à un régime de sécheresse KEMBLE et MAC PHERSON (1954), BARNETT et NAYLOR (1966), ROUTLEY (1966), HUBAC (1967).

N° du prélèvement	2		4		6		9	
	20°C	32°C	20°C	32°C	20°C	32°C	20°C	32°C
ASP.	18,2	12,5	12,2	10,4	3,8	6,7	7,4	12,1
ASP. NH_2	3,7	4,1	2,3	5,8	2,1	5,6	15,1	36,6
THR.	3,1	2,3	2,6	4,0	2,7	4,3	1,1	5,2
SER.	11,7	6,0	8,6	8,2	4,7	5,5	5,6	7,0
GLU.	35,4	26,1	21,9	24,5	15,2	25,3	15,9	22,5
GLU. NH_2	29,6	7,2	14,3	10,4	7,5	8,4	12,1	35,9
PRO.	1,6	0,7	3,9	1,3	6,2	2,6	13,5	6,5
CIT.	0,9	-	0,3	0,2	0,1	0,1	0,3	0,4
GLY.	2,2	0,6	0,8	0,5	0,5	0,6	0,5	0,8
ALA.	5,2	3,9	3,6	3,6	1,7	2,9	2,2	2,9
VAL.	0,7	0,5	0,7	0,5	0,4	0,4	1,1	1,6
CYS.	Traces	-	-	-	-	-	0,1	0,1
MET.	Traces	-	0,2	0,1	0,1	-	-	0,2
ILEU.	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,3	0,5	1,1
LEU.	0,7	0,4	0,7	0,5	0,7	0,4	1,0	1,6
TYR.	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,6	0,4	2,2
PHE.	0,9	0,6	0,8	0,7	0,5	0,8	0,9	1,3
ORN.	0,2	0,4	0,2	0,3	0,1	0,4	0,2	0,3
LYS.	0,4	0,4	0,6	0,5	0,6	0,5	0,7	1,2
TRY.	Traces	-	-	0,2	0,8	1,1	1,5	2,0
HIS.	0,2	0,2	0,3	0,4	0,3	0,7	0,8	2,3
ARG.	0,9	0,5	0,6	0,8	0,2	0,5	0,5	0,8

TABLEAU N° 2 : Teneurs en acides aminés libres, en micro-moles par gramme de poids sec, de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c., "sommets".

- après n + 72 heures à 20°C
- après n heures à 20°C + 72 heures à 32°C.

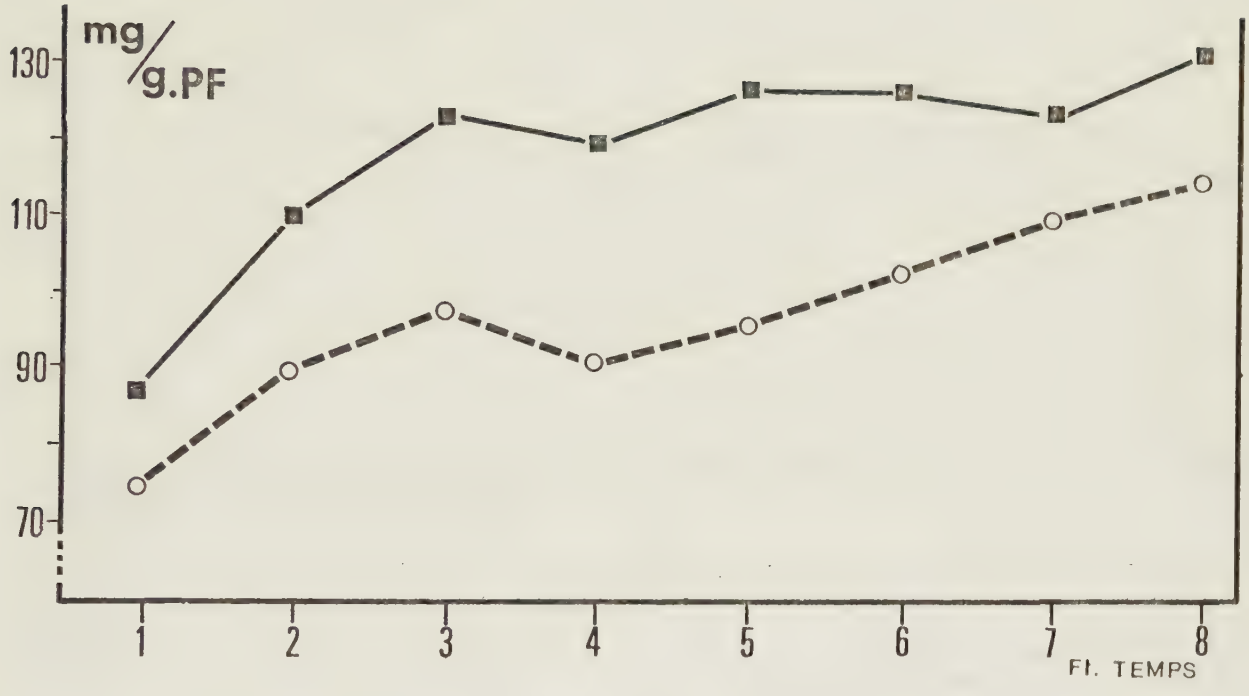


Fig. 7 : Variations du poids sec des feuilles de Nicotiana tabacum var. Xanthi n.c. en fonction de l'âge de la plante.

■—■ Plantes élevées à 20°C.

○--○ Plantes élevées à 20°C et transférées 72 heures à 32°C.

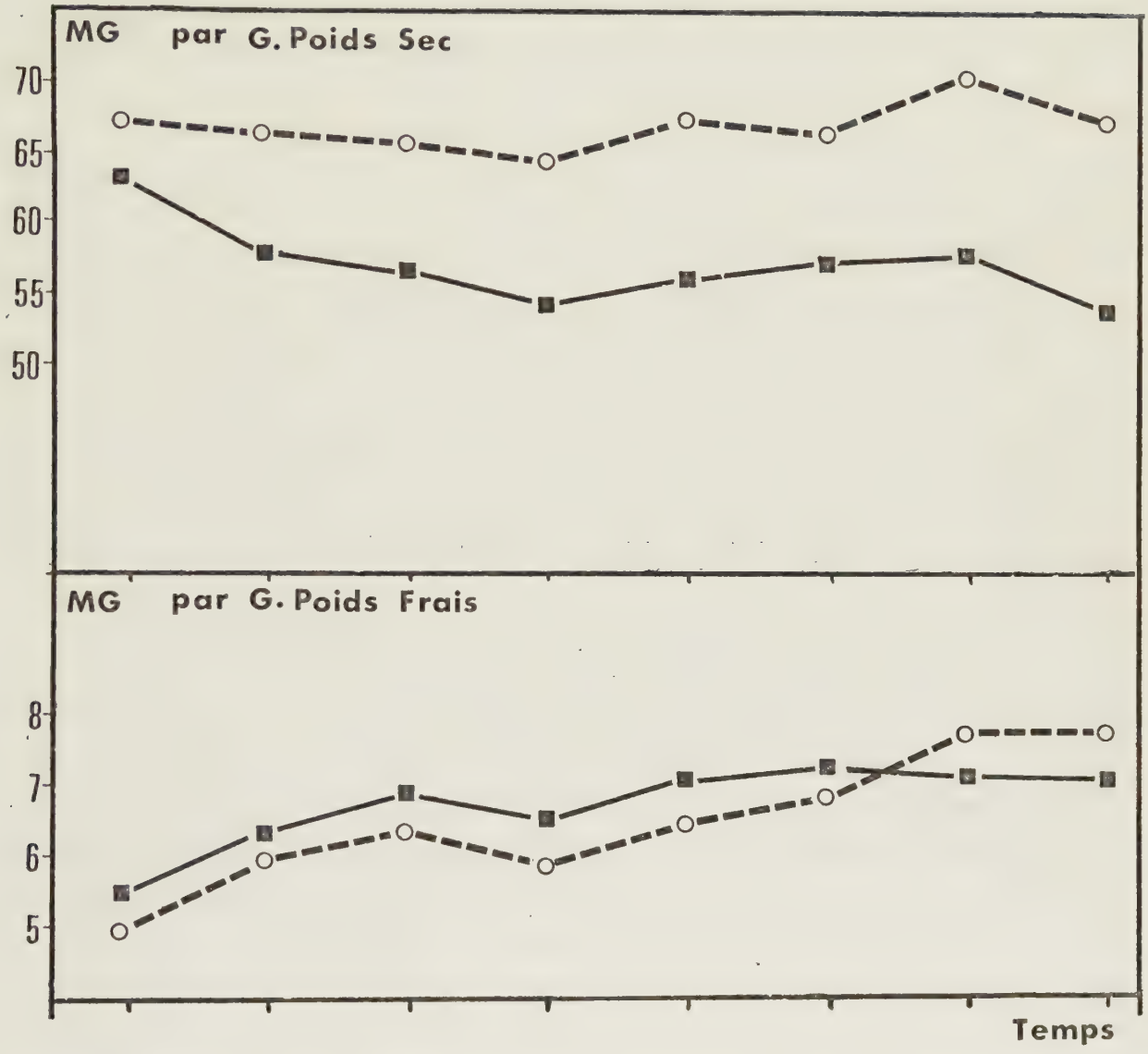


Fig. 8 : Quantité d'azote ramenée soit au poids sec, soit au poids frais, des feuilles du sommet de Nicotiana tabacum var. Xanthi n.c.

■—■ à 20°C.
○- -○ après 72 heures à 32°C.

Quoiqu'il en soit, que les résultats soient exprimés par rapport au poids sec ou au poids frais, la proline libre tend à s'accumuler dans les tissus du "sommet" de la plante, alors que se déroulent les mécanismes de la mise à fleurs. Après passage à 32°C, c'est-à-dire dans des conditions d'inhibition de floraison, la teneur en proline chute de façon importante.

Ces premiers résultats nous amènent à poser trois questions :

- Quelle est la teneur en proline libre de tabacs élevés en permanence à 32°C et demeurant, de ce fait, végétatifs, comparée à des plantes à 20°C évoluant du stade végétatif au stade floral ?

- Si comme certains auteurs l'ont démontré, la proline libre joue un rôle quelconque dans les mécanismes de résistance à la dessication, les variations de teneur en proline entre 20°C et 32°C ne sont-elles pas dues à une différence de teneur en eau de l'atmosphère ?

- Tous les prélèvements ayant été effectués toujours à la même heure de la journée, c'est-à-dire une heure après le début de la période lumineuse, la proline n'a-t-elle pas un comportement différent au cours de la journée suivant la température ; en d'autres termes, y-a-t-il toujours sur des *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. induits floralement et passés à 32°C, une chute de teneur en proline quelle que soit l'heure de la journée ?

Nous allons tenter de répondre à ces questions.

B - COMPARAISON DE TENEURS EN ACIDES AMINES LIBRES DE PLANTES ELEVEES A 20°C, OU A 32°C.

Ne pouvant effectuer les semis à 32°C, cette température étant défavorable au développement des jeunes plantules, l'expérience est commencée sur de jeunes tabacs élevés à 20°C jusqu'à l'âge de 30 jours :

- un lot de ces *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. est séparé en deux parties, l'une est laissée à 20°C, l'autre est placée à 32°C.
- les prélèvements sont faits lorsque les tabacs sont passés à l'état de reproduction à 20°C (stade boutons de l'ordre du millimètre), soit 7 semaines après le passage de la moitié du lot à 32°C.

	20°C	32°C		20°C	32°C
ASP.	0,96	0,96	CYS.	Traces	0,01
ASP. NH_2	1,17	0,34	MET.	-	0,01
THR.	0,40	0,30	ILEU.	0;07	0,05
SER.	0,97	0,52	LEU.	0,13	0,07
GLU.	2,08	2,57	TYR.	0,05	0,08
GLU. NH_2	2,22	0,45	PHE.	0,10	0,12
PRO.	1,65	0,15	ORN.	0,03	0,02
CIT.	0,04	traces	LYS.	0,04	0,07
GLY.	0,07	0,05	TRY.	0,07	0,05
ALA.	0,39	0,38	HIS.	0,04	0,07
VAL.	0,12	0,06	ARG.	0,05	0,06

TABLEAU N°3 : Comparaison des teneurs en acides aminés libres, en micromoles par gramme de poids frais, de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. :
- à 20°C et à l'état floral
- à 32°C et resté végétatif.

Les résultats d'une telle étude (tableau n° 3) montrent que la teneur en proline de tabacs élevés à 32°C est assez voisine de ce qu'elle est sur de jeunes plantes végétatives à 20°C. Elle ne représente jamais un pourcentage supérieur à 2,5 % du total des acides aminés libres.

Nous avons représenté sous forme d'histogramme (figure n° 9) les résultats concernant les acides aminés les plus fortement représentés.

Les amides qui, après un court séjour des plantes à 32°C, sont plus importantes, présentent, au contraire, une teneur inférieure ici à celle des tabacs élevés à 20°C.

Il faut noter à ce sujet que, si les résultats concernant la proline ont toujours été parfaitement reproductibles au cours des diverses expériences, ceux concernant les amides ont été sujets à des variations importantes difficilement interprétables actuellement. Il apparait pourtant que l'asparagine et la glutamine sont toujours importantes après un court passage à 32°C (soit après 3-6 ou IO jours à cette température).
Mais, leur teneur diminue lorsque le temps de passage à 32°C augmente. On peut considérer, peut-être, leur forte augmentation comme une réaction métabolique au transfert thermique.

En outre, nous avons pu noter que l'asparagine et la glutamine sont des composés présentant des variations très importantes d'une plante à une autre et dont le métabolisme varie au cours de la journée (STEWARD et DURZAN I965). Un léger décalage soit dans l'allumage des chambres, soit dans l'heure de prélèvement peut avoir une grande influence.

Il semble donc exister une étroite corrélation chez le *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. entre la teneur en proline des tissus et les processus conduisant à la reproduction sexuée.

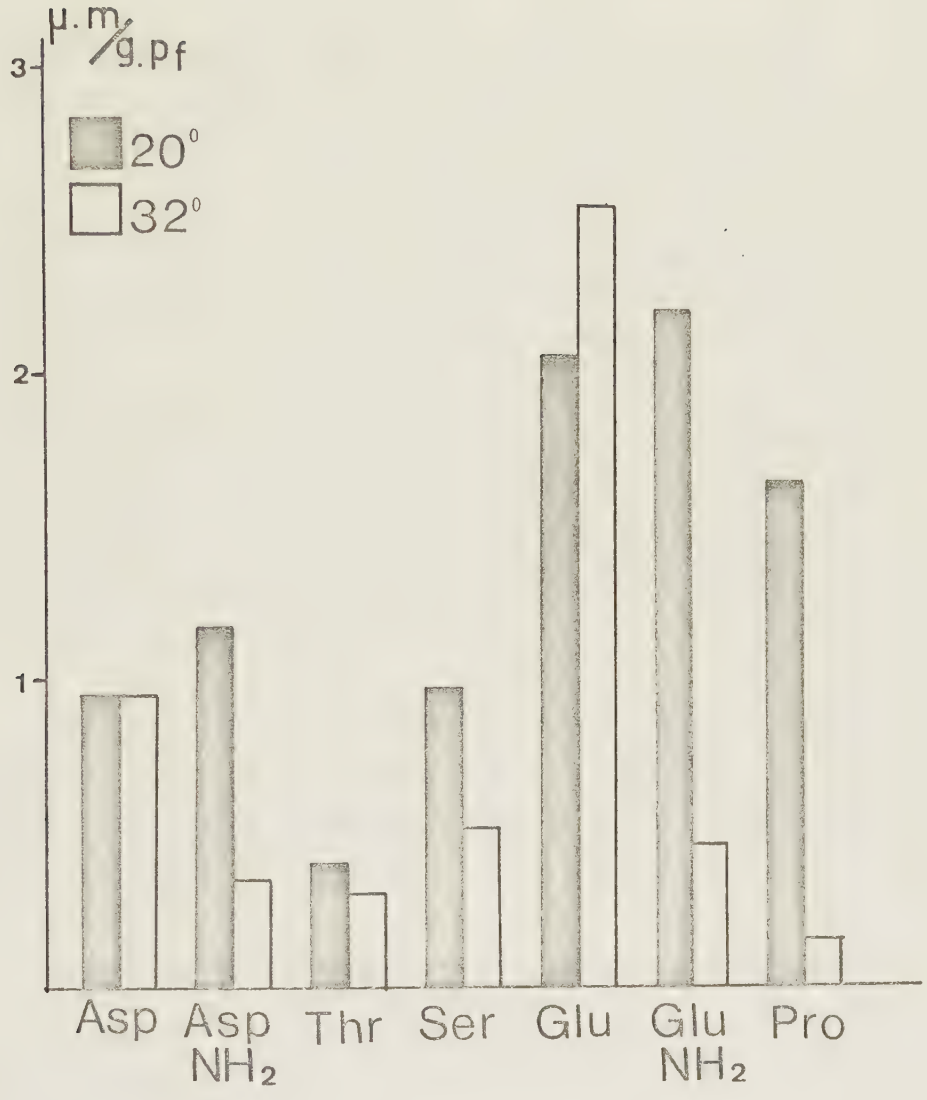


Fig. 9 : Teneur en certains acides aminés libres de "sommet" de Nicotiana tabacum var. Xanthi n.c.

● élevés à 20°C.
○ élevés à 32°C.

C - COMPARAISON DES TENEURS EN PROLINE DE TABACS A 20°C ET 32°C SOUS DES TENEURS EN EAU IDENTIQUES DE L'ATMOSPHERE

Comme nous l'avons signalé précédemment, le rôle de protection contre la dessication attribué par de nombreux auteurs à ce métabolite (BARNETT et NAYLOR, ROUTLEY, HUBAC...) nous a suggéré une autre expérience : si en dehors de la température, toutes les autres conditions, y compris l'humidité relative, sont identiques dans les deux salles climatisées à 20°C et 32°C, il y a cependant un facteur qui varie lors du passage à la température supérieure, c'est la teneur en eau de l'atmosphère : à 32°C, sous 80 % d'humidité relative, la teneur en eau de l'atmosphère (24,4 g/m3) est à peu près le double de celle de la chambre à 20°C (13,8 g/m3). Il était donc intéressant d'étudier les teneurs en proline de tabacs à 20°C et 32°C, l'air des salles climatisées renfermant la même quantité d'eau.

Il est possible d'obtenir une teneur en eau de la salle à 32°C identique à celle de la chambre à 20°C, présentant une humidité relative de 80%,il suffit pour cela d'amener l'humidité relative de la chambre à 32°C à 45 %.

Une partie d'un lot de tabacs, en voie de floraison à 20°C, est transférée à 32°C ;les plantes sont laissées 8 jours à cette température. Les dosages sont faits, comme précédemment, sur le "sommet" de la plante.

	20°C	32°C		20°C	32°C
ASP.	1,78	1,78	CYS.	Traces	Traces
ASP. NH_2	1,16	6,66	MET.	-	-
THR.	0,45	0,61	ILEU.	0,09	0,13
SER.	1,25	1,11	LEU.	0,18	0,26
GLU.	4,24	4,36	TYR.	0,04	0,42
GLU. NH_2	2,58	5,10	PHE.	0,16	0,26
PRO.	1,52	0,36	ORN.	0,07	0,13
CIT.	Traces	Traces	LYS.	0,13	0,32
GLY.	0,09	0,25	TRY.	0,09	0,20
ALA.	0,75	0,95	HIS.	0,07	0,39
VAL.	0,10	0,17	ARG.	0,15	0,52

TABLEAU N° 4 : Comparaison des teneurs en certains acides aminés de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. entre 20°C et 32°C sous une même teneur en eau de l'atmosphère.

On voit sur le tableau n° 4 que le changement d'humidité relative n'a pas modifié le phénomène observé ; la chute de la teneur en proline, après un séjour de la plante à 32°C, n'est pas en relation avec l'humidité de l'atmosphère, mais elle est plutôt corrélative des mécanismes de la mise à fleurs. On retrouve d'ailleurs toutes les modifications biochimiques déjà notées après un passage relativement court à 32°C, à savoir :

- la chute spectaculaire de la teneur en proline.
- l'accumulation d'amides.
- l'élévation de teneur de certains acides aminés.

Nous avons porté sous forme d'histogramme (figure n° 10) les valeurs comparées des acides aminés les plus importants quantitativement.

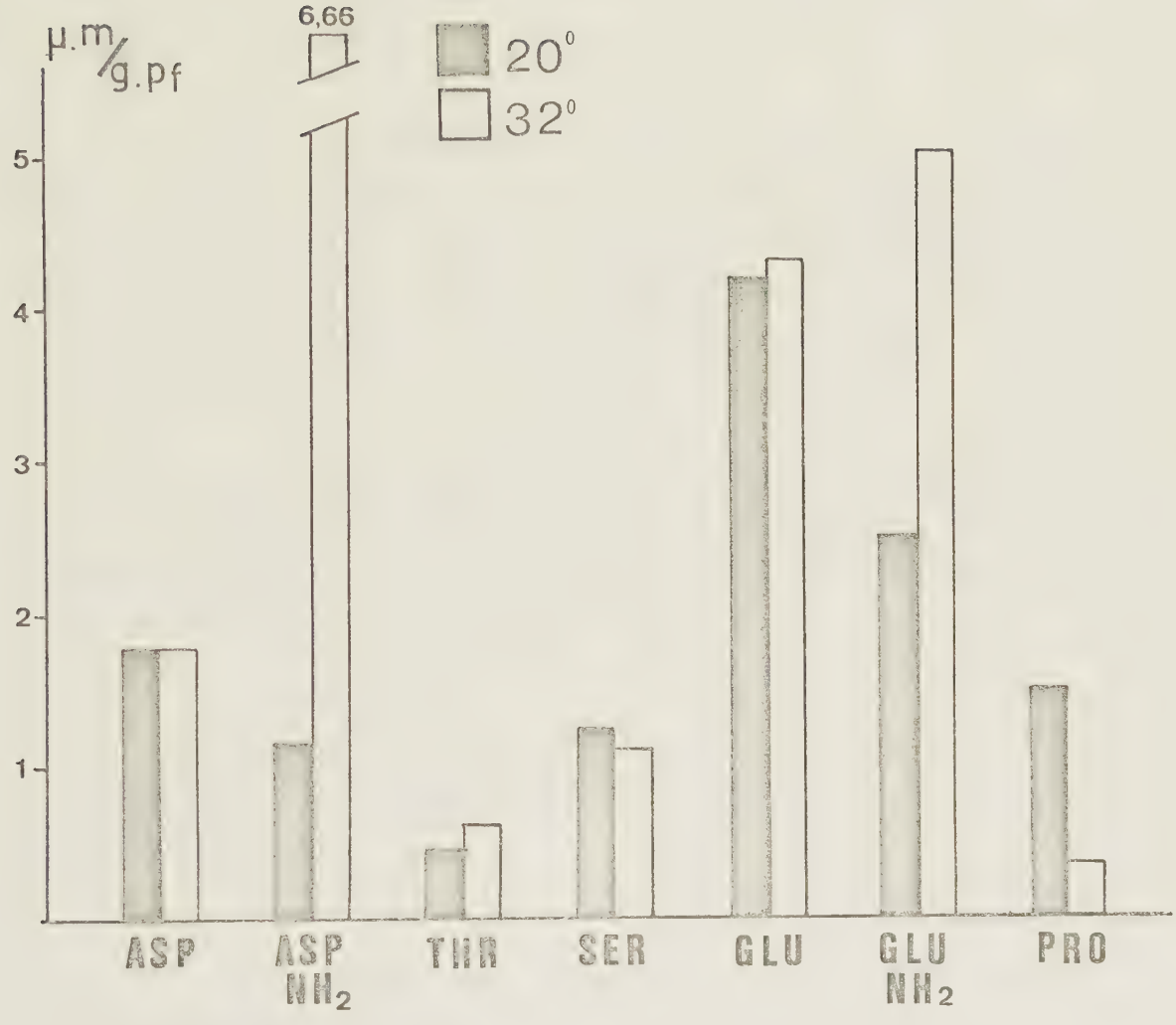


Fig. IO : Comparaison des teneurs en certains acides aminés libres de Nicotiana tabacum var. Xanthi n.c., entre 20°C et 32°C, sous une même teneur en eau de l'atmosphère.

On pourrait penser que l'augmentation des amides est en relation avec la diminution de la proline ; cependant les faibles teneurs en asparagine et glutamine trouvées chez les tabacs élevés depuis longtemps à 32°C semblent indiquer que ce n'est pas le cas.

Il y a donc, à 20°C, une augmentation de teneur en proline libre chez *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. au fur et à mesure du développement de la plante.

A 32°C, c'est-à-dire dans des conditions qui ne permettent pas la formation d'organes de reproduction chez le tabac, la quantité de proline ne subit que peu de variations. De plus, un court séjour à 32°C de tabacs qui, préalablement élevés à 20°C,sont à fleurs, conduit à une importante diminution de la teneur en proline des tissus du "sommet".

Il restait alors à déterminer, si, quelle que soit l'heure de la période lumineuse à laquelle on effectue les prélèvements, on retrouve toujours la même diminution de la quantité de proline après passage à 32°C.

D - INFLUENCE DE L'HEURE DE PRELEVEMENT AU COURS DE LA PERIODE LUMINEUSE

Un lot de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. à l'état floral (ébauche de boutons visible à l'oeil nu) est séparé comme précédemment en deux parties :

- l'une est laissée à 20°C.
- l'autre est placée à 32°C.

Après 72 heures, on effectue les prélèvements des "sommets", à 20°C et 32°C, toutes les heures durant la période lumineuse, c'est-à-dire pendant 16 heures.

La figure n° 11 montre que, quelle que soit l'heure de la journée, le contenu en proline libre des tissus à 32°C est plus faible que pour ceux restés à 20°C. C'est ce que nous cherchions à prouver : la chute de teneur en proline consécutive à un passage des plantes à 32°C est indépendante de l'heure de la période lumineuse à laquelle les prélèvements sont faits.

Mais, en outre, cette expérience nous a également révélé l'existence de variations nyctémérales non négligeables et particulièrement à 20°C. On a un maximum de teneur après 6 heures d'éclairement et un deuxième maximum après IO heures. On peut admettre qu'il y a chez *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. des rythmes de synthèse et de dégradation de la proline, ou bien des rythmes d'utilisation et de non utilisation. N'existe-t-il pas suivant l'heure de la période lumineuse des rythmes de synthèse protéique ? Certains auteurs, tels que KLYACHKO et KULAEVA (I965), sur tabac (*Nicotiana rustica*) ont démontré l'existence d'une périodicité de synthèse protéique dans la journée. L'explication biochimique, selon les auteurs est encore inconnue, mais on peut imaginer des phénomènes d'activation et d'inactivation de la synthèse des protéines.

De plus, si on examine la figure n° 11, on remarque une atténuation considérable des variations "nyctémérales" de la proline à 32°C. Deux questions se posent :

- Ces variations existeraient-elles après 8-10 ou 15 jours à 32°C ?
- Existent-elles également chez une plante végétative ?

Une étude plus approfondie de ce phénomène serait à entreprendre.

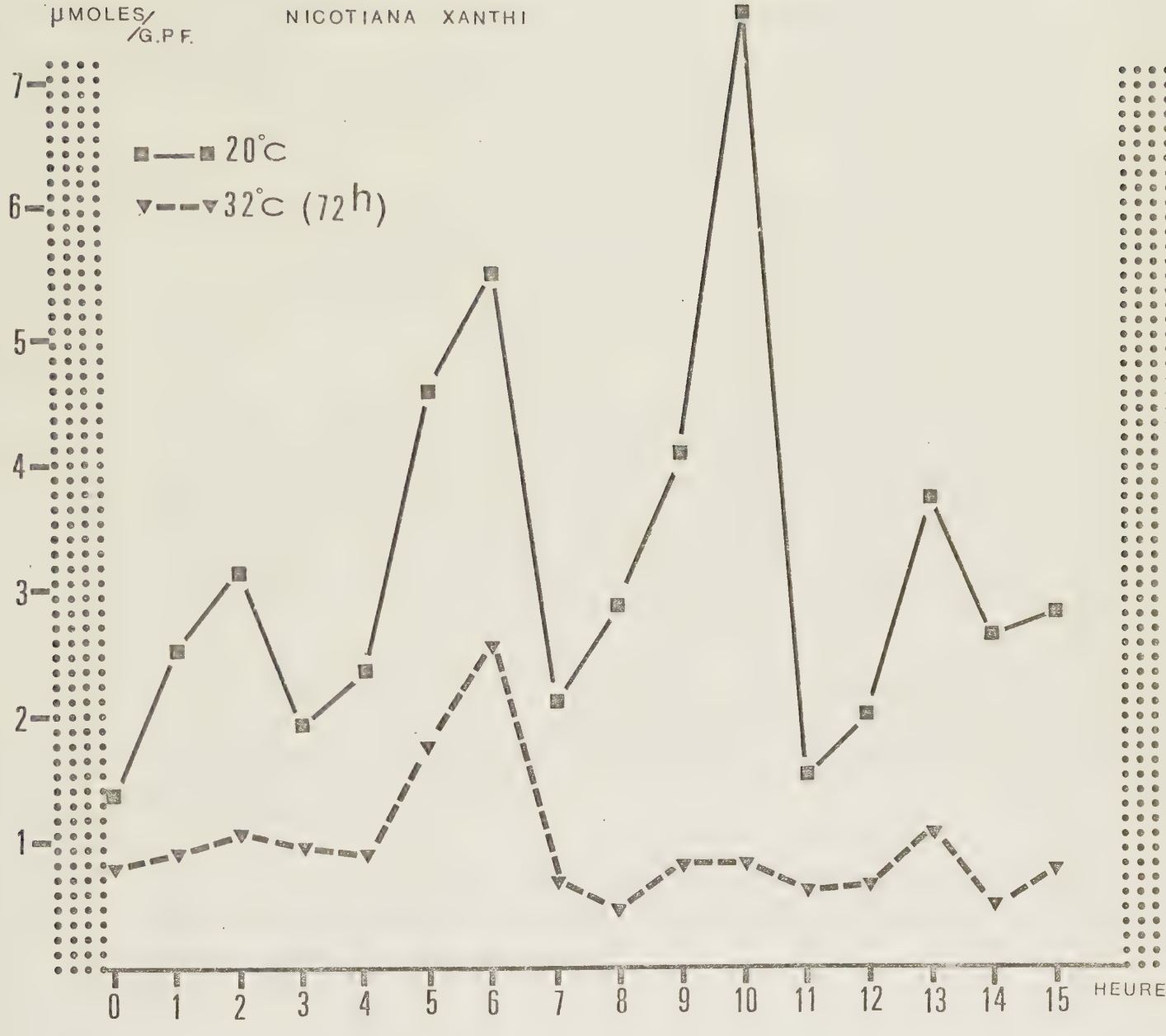


Fig. II : Variations des teneurs en proline libre des sommets de Nicotiana tabacum var. Xanthi n.c., floraux, à 20°C ou après 72 heures à 32°C, suivant l'heure de la période lumineuse.

Les variations de teneur en proline libre sont donc bien corrélatives des mécanismes du passage à l'état reproducteur. Néanmoins tous les résultats que nous avons obtenus l'ont été sur *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. plante relativement indifférente à la photopériode, mais beaucoup plus sensible à la température. Il était intéressant de voir si on retrouve des modifications semblables au niveau de la proline chez des tabacs photopériodiques mis en conditions favorables ou défavorables à la floraison.

E - ANALYSE DES ACIDES AMINES LIBRES CHEZ DES TABACS PHOTOPERIODIQUES

Nous avons effectué ce type d'expérience non plus sur des *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. en fonction de la température, mais sur des *Nicotiana sylvestris*, en fonction de la photopériode, c'est-à-dire sur des *Nicotiana sylvestris*, à 20°C en jours longs et, sur des *Nicotiana sylvestris* élevés à 20°C en jours longs, mais placés 72 heures avant l'essai en jours courts.

De plusieurs expériences faites suivant l'heure de prélèvement au cours de la période lumineuse, il apparaît que les résultats sont semblables à ceux obtenus sur *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. (figure n° 12).

Il y a en jours longs, chez *Nicotiana sylvestris*, une forte teneur en proline libre. Elle est, du reste, l'acide aminé le plus important quantitativement.

Après passage en jours courts, la teneur en proline subit une chute considérable ; la teneur passe ici de 5,7 micromoles par gramme de poids frais à moins de 1,5 micromole. Les résultats sont donc tout à fait comparables à ceux énoncés précédemment.

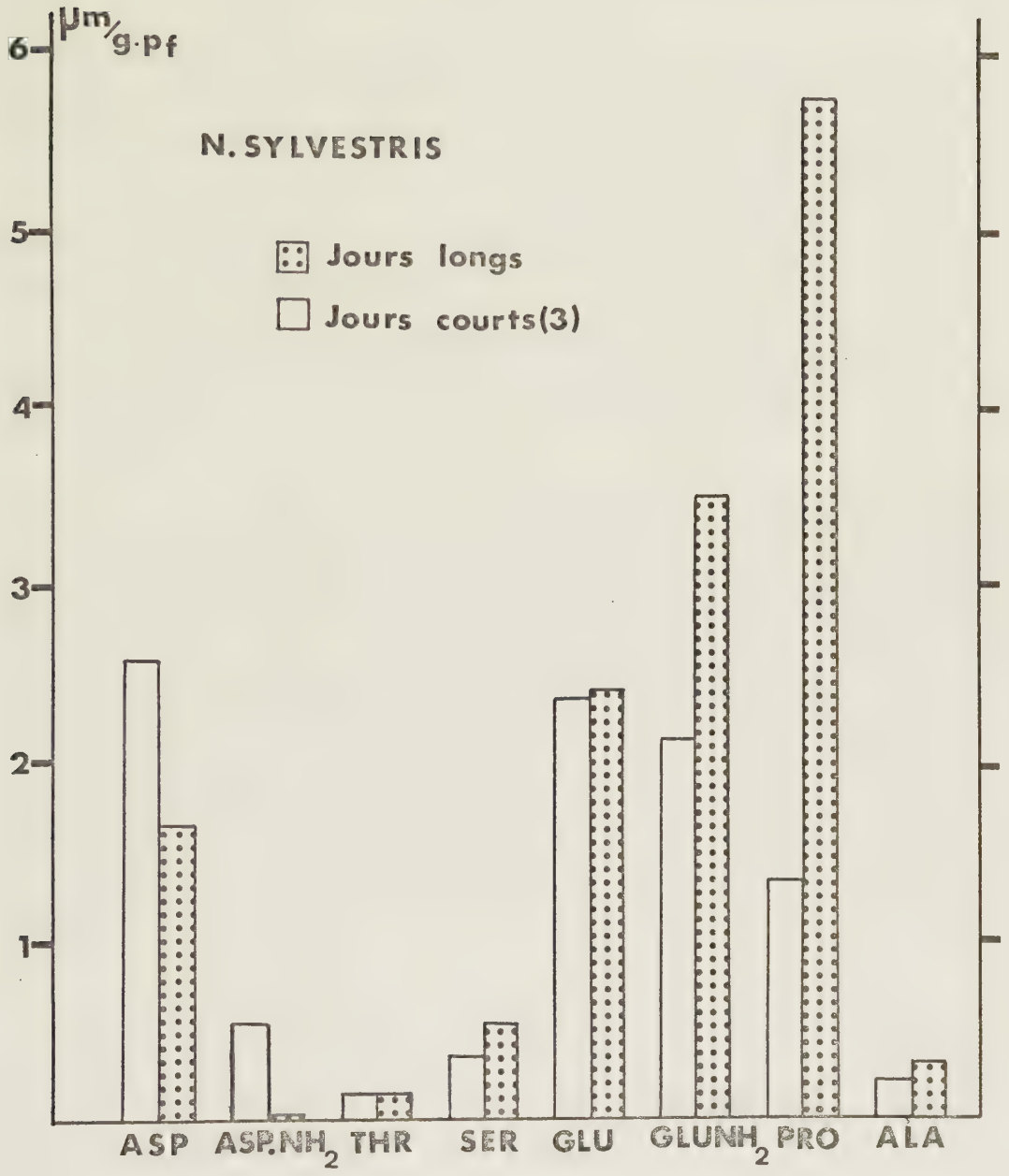


Fig. I2 : Comparaison des teneurs en certains acides aminés libres de "sommet" de Nicotiana sylvestris floraux, en jours longs ou après 3 jours courts.

Les autres acides aminés ne présentent que quelques fluctuations d'un échantillon à l'autre. Seules, comme pour *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c., les amides sont plus importantes après un passage de 72 heures en conditions non inductives.

Il serait néanmoins intéressant d'approfondir ces résultats : en effet, nous avons toujours retrouvé une chute de teneur en proline libre après passage de *Nicotiana sylvestris* en jours courts, mais avec des proportions très différentes, principalement suivant l'heure de la période lumineuse à laquelle les prélèvements sont effectués.

En outre, il serait nécessaire d'étudier d'une façon plus détaillée le comportement de cette plante en fonction de la photopériode.

Il semble donc exister chez divers *Nicotiana* une certaine corrélation entre teneurs en proline libre des tissus et les processus conduisant à la reproduction sexuée. Nous venons, en effet, de voir que la proline s'accumule à 20°C au fur et à mesure que se déroulent les processus physiologiques de la floraison. Placés dans des conditions défavorables à la mise à fleurs, soit à haute température, soit en dyspériodes, les mêmes tissus ne présentent que des quantités relativement faibles de cet acide aminé ; un simple séjour dans ces conditions suffit à diminuer sa teneur de façon importante.

On ne peut pas, cependant, affirmer qu'elle joue un rôle direct dans ces mécanismes, elle est en quelque sorte le reflet d'autres changements métaboliques accompagnant la transformation du méristème végétatif en méristème inflorescentiel. Ce sont ces changements que nous avons tenté de mettre en évidence ; mais auparavant, il nous est apparu nécessaire de préciser la nature des tissus ou organes affectés par ces modifications biochimiques.

∿∿∿∿

CHAPITRE II

LOCALISATION DES VARIATIONS DE TENEUR EN PROLINE LIBRE CHEZ *NICOTIANA TABACUM* var. Xanthi n.c.

Cette partie se divise en deux sous- chapitres : En effet, nous avons vu que la proline commence à s'accumuler dans les tissus du sommet de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. dès l'induction florale, donc, dès la transformation du méristème, avant l'apparition de fleurs ; mais nous avons vu aussi que cette accumulation se poursuivait au fur et à mesure de l'épanouissement des fleurs. En conséquence, nous avons distingué, d'une part les organes floraux, d'autre part les organes végétatifs ; nous verrons ainsi que suivant le stade de développement la proline libre est prépondérante tantôt dans un tissu, tantôt dans un autre.

A - COMPARAISON INFLORESCENCE-FEUILLES D'UNE MEME PLANTE ; INFLUENCE DE LA TEMPERATURE.

Dans un premier type d'expérience, nous avons voulu rechercher dans quels organes se situe l'accumulation de proline.

Des *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. dont l'induction florale a eu lieu, sont pour moitié laissés à 20°C et pour moitié placés à 32°C. Les prélèvements à ces deux températures sont effectués lorsque les fleurs sont en voie d'épanouissement (à noter que toutes les fleurs ne sont pas exactement au même stade, certaines sont déjà épanouies et leurs anthères en voie de déhiscence).

A l'examen du tableau n° 6, il apparaît qu'à 20°C, la teneur en acides aminés libres est beaucoup plus importante dans l'inflorescence que dans les feuilles ; en particulier, 80 à 85 % de la proline libre, présente dans les tissus de la plante, sont localisés dans l'inflorescence.

Après un séjour à 32°C, les acides aminés libres sont toujours plus fortement représentés dans l'inflorescence. Mais c'est au niveau de cette inflorescence qu'a lieu la chute de proline consécutive à un séjour de la plante à cette température. En effet, nous voyons qu'au niveau des feuilles, la teneur en proline ne subit aucune variation par rapport à celle trouvée à 20°C. Il en est de même pour les deux amides qui s'accumulent à 32°C dans l'inflorescence où elles représentent 98 % du total de ces deux composés présents dans l'ensemble inflorescence - feuilles analysées.

Notons, toutefois à ce sujet, que la diminution de teneur en proline est moins importante que précédemment, nous verrons plus loin les raisons de cette différence.

En conclusion, la proline qui s'accumule dans la plante à partir de l'induction florale est localisée essentiellement dans les tissus inflorescentiels lors de l'épanouissement des fleurs. Après un séjour à 32°C, la chute de teneur de cet acide aminé correspond, également, à une diminution au niveau de ces mêmes tissus et non au niveau des feuilles.

A la suite de cette première expérience, on peut, comme dans le premier chapitre, poser un certain nombre de questions auxquelles on doit tenter de répondre :

- nous venons de voir que la teneur en proline libre est faible dans les feuilles de tabacs en voie de floraison. Est-ce le cas avant l'épanouissement des fleurs ?

	INFLORESCENCE		FEUILLES	
	20°C	32°C	20°C	32°C
ASP.	1,92	1,88	0,22	0,49
ASP.NH_2	2,68	12,49	0,12	0,21
THR.	0,65	0,73	0,08	0,28
SER.	1,67	1,19	0,27	0,47
GLU.	2,50	2,79	1,04	1,82
GLU.NH_2	4,24	12,24	Traces	0,10
PRO.	2,82	1,60	0,15	0,14
CIT.	Traces	Traces	Traces	Traces
GLY.	0,17	0,21	0,03	0,04
ALA.	0,50	1,09	0,15	0,29
VAL.	0,41	0,40	0,03	0,03
CYS.	Traces	Traces	Traces	Traces
MET.	"	"	"	"
ILEU.	0,21	0,22	0,01	0,01
LEU.	0,31	0,27	0,02	0,02
TYR.	0,17	0,30	0,01	0,02
PHE.	0,19	0,21	0,05	0,04
ORN.	0,09	0,09	0,02	--
LYS.	0,22	0,25	0,08	0,03
TRY.	0,48	0,26	Traces	Traces
HIS.	0,26	0,46	0,03	0,02
ARG.	0,11	0,24	0,08	0,03

TABLEAU N° 6 : Comparaison, entre 20°C et 32°C, des teneurs en acides aminés libres, en micromoles par gramme de poids frais, de l'inflorescence et des feuilles de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c.

- au moment de l'épanouissement des fleurs, dans quels tissus de la fleur est située la proline ? Les nombreux travaux effetués à ce sujet, en particulier par TUPY (1961), BRITIKOV et ses collaborateurs (1965 et 1966), LINDER et COUSTAUT (1966) qui montrent l'importance de cet acide aminé au niveau du grain de pollen, nous ont amené à déterminer le contenu en proline des diverses parties de la fleur de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. et à rechercher si la température le modifie.

B - TENEUR EN PROLINE LIBRE DES FEUILLES DE *NICOTIANA TABACUM* var. Xanthi n.c., AVANT ET APRES APPARITION DES FLEURS.

Des *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c., en voie de floraison (boutons floraux de l'ordre du centimètre) ainsi que des *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. préfloraux (pas de boutons visibles), préalablement élevés à 20°C, sont placés au temps 0 moitié à 20°C, moitié à 32°C.

Après 72 heures, on prélève, pour analyse, les feuilles du "sommet", c'est-à-dire les jeunes feuilles entourant le bourgeon terminal, ainsi que deux feuilles ayant terminé leur croissance.

Les résultats (figure n° 13) montrent que, comme précédemment, les feuilles de tabacs floraux ont une teneur assez faible en proline libre. Un passage à 32°C affecte relativement peu la teneur de cet acide aminé.

Cependant les valeurs de la proline libre sont plus élevées que dans l'expérience précédente. Ceci est dû, comme nous l'avons précédemment signalé, au changement de salles climatisées (augmentation de l'éclairement).

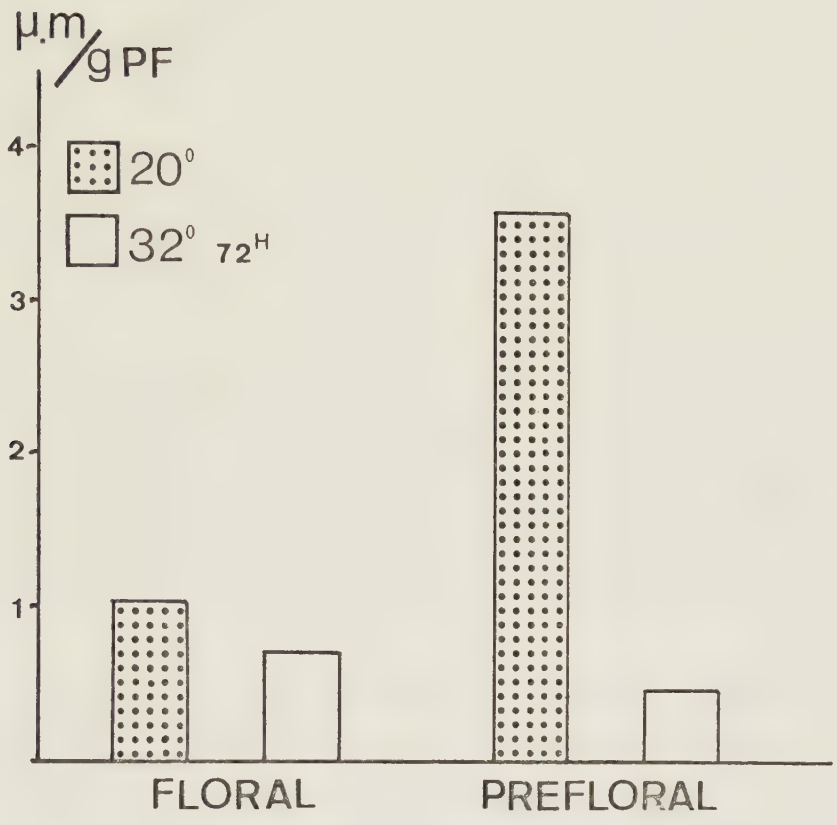


Fig. I3 : Comparaison de teneur en proline libre de jeunes feuilles de Nicotiana tabacum var. Xanthi n.c. au stade préfloral ou floral.

En effet, la teneur des divers acides aminés libres varie de façon importante avec l'éclairement. Nous avons effectué les premières expériences sur des tabacs soumis à un éclairement de 8 000 lux ; par la suite, dans de nouvelles salles climatisées avec 12 000 lux, nous avons constaté que la teneur de la plupart des acides aminés est augmentée de 20 à 40 %. En outre il est intéressant de noter que, si la teneur des acides aminés et celle de la proline plus spécialement, s'accroît avec l'éclairement, il faut par contre, augmenter la température pour avoir la même inhibition de floraison et la même diminution de teneur en proline.

Par contre sur les plantes au stade préfloral, on voit que la proline libre est très importante dans les feuilles et que le passage à 32°C provoque une baisse importante de sa teneur.

Plusieurs expériences effectuées dans les mêmes conditions ont fourni des résultats identiques, mais avec des variations relatives de la proline d'un essai à l'autre. En fait, les prélèvements au stade préfloral sont difficiles à faire d'une manière identique. Ce sont d'ailleurs ces échantillons qui sont responsables des variations trouvées d'un dosage à l'autre.

En conclusion, la proline libre qui est très importante dans le "sommet" de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. floral est localisée dans les tissus de l'inflorescence. Toutefois avant l'apparition des fleurs, la proline est localisée dans les feuilles. On peut penser que la proline, synthétisée dans les feuilles, reste en place jusqu'à l'apparition des fleurs et migre ensuite dans les boutons floraux.

Après passage à 32°C, une fraction du contenu en proline libre est affectée par cette élévation de température, soit au niveau des feuilles, soit au niveau de l'inflorescence.

Jusqu'à présent tous nos essais ont été faits sur le "sommet" de la plante, à savoir le bourgeon terminal (végétatif ou inflorescentiel) accompagné des feuilles qui l'entourent. Or AGHION-PRAT (1965) a montré, par culture in vitro de fragments de tiges prélevés à différents niveaux, qu'il existe "un gradient de propension à la floraison" chez divers *Nicotiana tabacum* à photopériodisme non absolu, c'est le cas, entre autres, pour *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c.

C - GRADIENT DE PROLINE AU NIVEAU DE LA TIGE

Des essais ont été effectués sur *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. à 20°C et après 72 heures à 32°C. Par comparaison, on a réalisé des expériences semblables chez *Nicotiana sylvestris*, d'une part en fonction de la température, mais aussi en conditions photopériodiques favorables ou défavorables.

a) Gradient de proline libre chez *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. (VALLEE - PERDRIZET - VANSUYT, 1969)

Une partie d'un lot de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c., préfloral à 20°C (boutons floraux non encore visibles) est placée à 32°C. Le prélèvement des tiges est effectué après 72 heures de séjour, soit à 20°C, soit à 32°C. Les analyses sont effectuées sur 5 fractions de tiges effeuillées :

la première (1) comprend le bourgeon terminal et environ 1 centimètre de tige ; les suivantes (2 à 5) correspondent chacune à 4 entre-nœuds, en allant du sommet vers la base (figure n° 14).

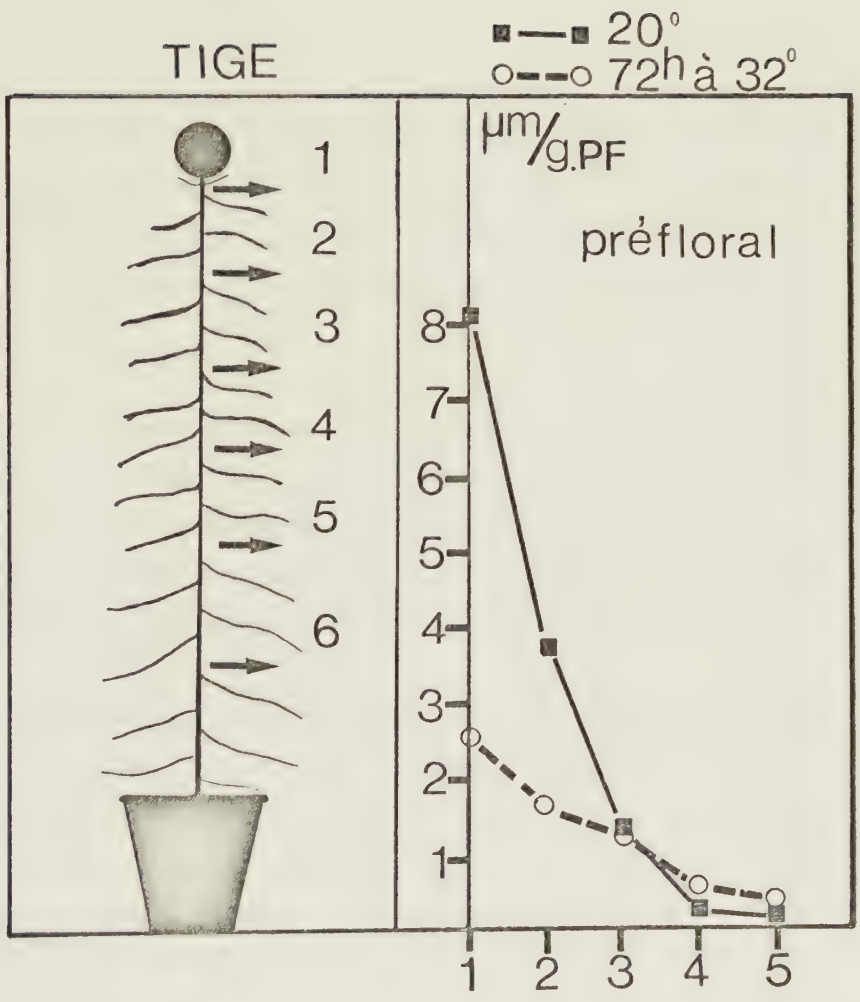


Fig. I4 : Teneur en proline libre des diverses portions de la tige de Nicotiana tabacum var. Xanthi n.c. préfloral à 20°C ou après 72 heures de transfert à 32°C.

Rapportée en micromoles par gramme de poids frais, la teneur en proline montre un gradient croissant de la base vers l'apex. En effet, cette teneur passe de 0,18 micromole dans les fragments les plus bas à plus de 8 micromoles dans les parties supérieures.

Après 72 heures à 32°C, le contenu en proline diminue fortement dans les fractions supérieures et, de ce fait, le gradient est considérablement réduit.

Il apparait, en outre, qu'à ce stade les tissus de la tige de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. sont autant, sinon plus, riches en proline que les feuilles correspondantes, et qu'un passage à une température élevée affecte aussi profondément le contenu en proline.

Compte tenu des résultats obtenus sur feuilles de tabacs préfloraux et floraux, nous avons recommencé les expériences sur tiges en utilisant des *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. floraux (quelques boutons visibles à l'oeil nu ayant de 2 à 4 mm de long) placés dans les mêmes conditions à 20°C et 32°C.

Dans ces conditions, on obtient six fractions de tige. Le tableau n° 7 montre que tous les acides aminés présentent un léger gradient de la base vers le bourgeon terminal, mais comme précédemment, seule la proline montre une augmentation à la fois sensible et régulière à mesure que l'on se rapproche du sommet. Sa teneur passe de 0,24 micromole par gramme de poids frais dans le fragment le plus bas, à 6,7 micromoles dans les tissus de l'apex (figure n° 15).

Fragments de tige	I	II	III	IV	V	VI
ASP.	0,92	0,31	0,40	0,23	0,15	0,21
ASP.NH_2	2,38	0,50	0,34	0,28	0,28	0,22
THR.	0,85	0,47	0,37	0,25	0,19	0,24
SER.	1,45	1,03	0,69	0,49	0,31	0,39
GLU.	1,53	2,95	0,61	0,64	0,51	0,59
GLU.NH_2	7,18	1,10	0,97	0,76	0,82	0,72
PRO.	6,70	4,18	2,06	0,51	0,25	0,24
GLY.	0,33	0,24	0,18	0,16	0,14	0,18
ALA.	2,50	2,05	1,20	1,16	0,67	1,13
VAL.	0,21	0,14	0,16	0,14	0,10	0,09
ILEU.	0,25	0,19	0,18	0,12	0,10	0,10
LEU.	0,40	0,44	0,14	0,13	0,11	0,15
TYR.	0,09	0,07	0,07	0,06	0,04	0,05
PHE.	0,37	0,13	0,10	0,08	0,05	0,06
LYS.	0,27	0,12	0,11	0,10	0,09	0,10

ARG., CIT., CYS., HIS., MET., TRY., à l'état de traces.

TABLEAU N° 7 (a) : Teneur en acides aminés libres, en µmoles/g. de poids frais, des différentes parties de la tige de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c., élevé à 20°C.

Fragments de tige	I	II	III	IV	V	VI
ASP.	1,00	0,40	0,32	0,25	0,18	0,22
ASP.NH_2	4,95	0,88	0,37	0,30	0,31	0,12
THR.	1,26	0,51	0,42	0,26	0,24	0,20
SER.	2,07	0,74	0,46	0,36	0,47	0,25
GLU.	2,95	0,94	1,10	0,89	0,66	0,73
GLU.NH_2	11,13	1,59	0,84	0,84	0,69	0,53
PRO.	4,20	0,85	0,42	0,23	0,14	0,17
GLY.	0,45	0,20	0,16	0,10	0,12	0,15
ALA.	2,68	1,50	1,10	0,95	0,49	0,62
VAL.	0,46	0,13	0,12	0,09	0,06	0,09
ILEU.	0,25	0,10	0,11	0,06	0,05	0,06
LEU.	0,44	0,14	0,13	0,11	0,06	0,07
TYR.	0,39	0,11	0,08	0,06	0,04	0,05
PHE.	0,36	0,17	0,15	0,11	0,06	0,06
LYS.	0,36	0,11	0,07	0,05	0,06	0,05

ARG., CIT., CYS., HIS., MET., TRY., à l'état de traces.

TABLEAU N° 7 (b) : Teneur en acides aminés libres, en µmoles/g. de poids frais, des différentes parties de la tige de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. élevé à 20°C et, après séjour de 72 heures à 32°C.

On note également qu'après 72 heures à 32°C le gradient est considérablement réduit. Cependant dans le bourgeon terminal la chute est moins importante que dans le premier essai ; nous rejoignons ici les résultats obtenus dans l'essai comparatif de teneur en acides aminés de l'inflorescence et des feuilles (voir page 58). Nous verrons plus loin l'explication de ce phénomène.

Si on exprime les résultats en pourcentage de proline par rapport au total des acides aminés (figure n° 15 a), on retrouve à 20°C le gradient de proline ; ainsi le pourcentage de cet acide aminé croit de 5 % au niveau de la base à plus de 35 % au niveau des parties supérieures. Seul l'echantillon 1 est abaissé du fait des fortes teneurs en amides.

Cette forme d'expression des résultats accentue l'importance de la diminution de teneur en proline des tissus après un séjour à 32°C. Elle met en relief le comportement particulier de cet acide aminé par rapport aux autres, et spécialement par rapport aux amides, qui, si elles se trouvent en quantité importante dans le bourgeon terminal, sont encore plus abondantes après un séjour à 32°C.

Il nous reste à voir si on retrouve, chez *Nicotiana sylvestris* des résultats analogues ou fondamentalement différents puisque, comme l'a montré AGHION-PRAT (1965), les tabacs à photopériodisme absolu ne semblent pas présenter de "gradient de floraison".

b) Gradient de proline chez *Nicotiana sylvestris*

Les expériences sont faites, d'une part, en fonction de la température, en jours longs, c'est-à-dire sous photopériode favorable, mais aussi à 20°C, soit en jours longs, soit en jours courts.

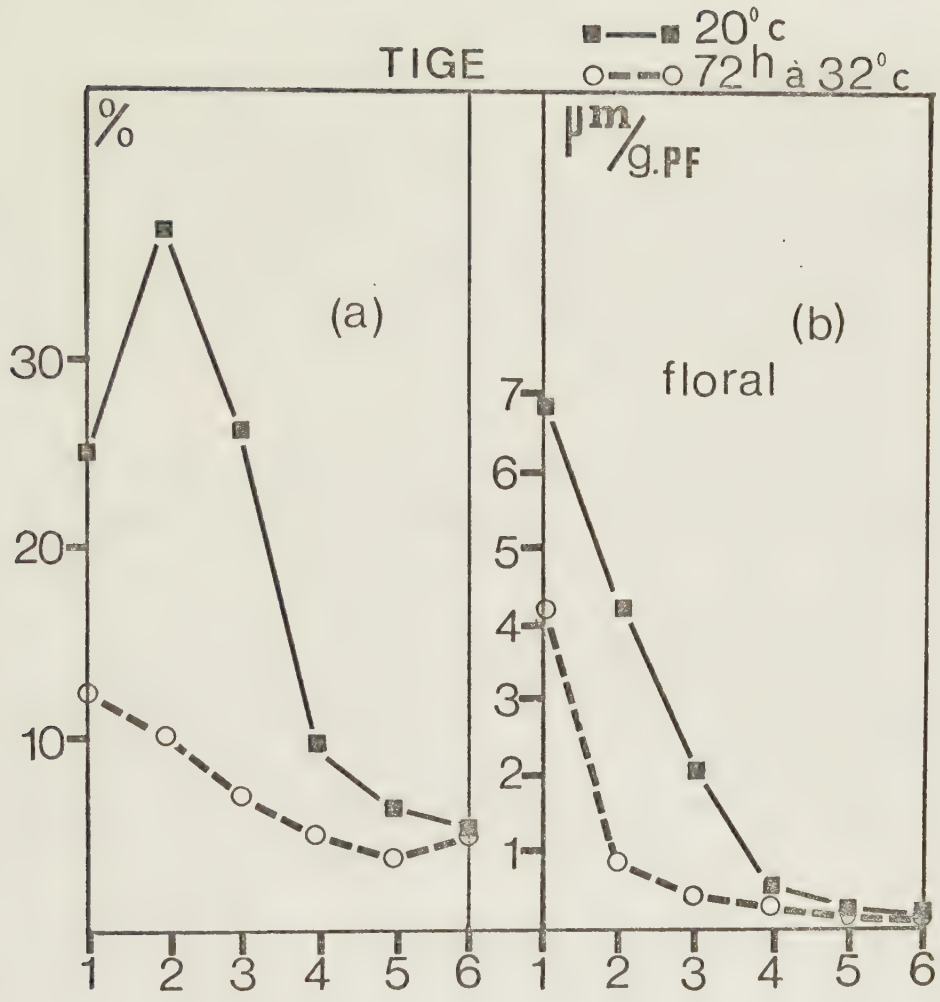


Fig. I5 : Pourcentage (a) et teneur (b) en proline libre de diverses portions de la tige de Nicotiana tabacum var. Xanthi n.c., floral à 20°C et après 72 heures de transfert à 32°C.

- En fonction de la température :

Comme nous l'avons vu (p. 9) le *Nicotiana sylvestris* est moins sensible aux températures élevées que le *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. Après un passage à 32°C, il fleurit seulement un peu moins rapidement qu'à 20°C.

Nos essais ont porté sur la tige de *Nicotiana sylvestris* à 20°C et après 72 heures à 32°C d'abord, mais aussi à 20°C et après 6 semaines à 32°C ; dans ce dernier cas, au moment du prélèvement, les *Nicotiana sylvestris*, qui sont en rosette à l'état végétatif, présentent déjà une élongation importante des entre-noeuds, mais aucun bouton floral n'est visible, alors que les témoins à 20°C sont en fleurs.

Ces tabacs forment moins de feuilles que les *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. avant d'émettre leurs fleurs, les échantillons sont prélevés tous les 3 entre-noeuds.

Il existe aussi chez *Nicotiana sylvestris* (figure n° 16 a et b) un gradient de proline le long de la tige. Après 72 heures à 32°C (figure n° 16, a), le gradient, bien que légèrement plus faible, existe néanmoins alors que, chez le *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c., il est fortement perturbé.

Après 6 semaines à 32°C (figure n°16 b) alors que la mise à fleurs est ralentie, le gradient n'existe plus.

Ces résultats confirment bien les observations effectuées sur les différences de sensibilité des deux tabacs à la température de 32°C. Mais cette plante étant plus sensible à la photopériode, il nous a paru utile d'effectuer quelques expériences sur des *Nicotiana sylvestris*, laissés à 20°C en jours longs et, des *Nicotiana sylvestris*, élevés en jours longs et placés 72 heures en jours courts. Il n'a pas été possible d'effectuer la même expérience en plaçant les plantes plusieurs semaines en jours courts, puisque, dans ces conditions, les tabacs de cette espèce restent en rosette.

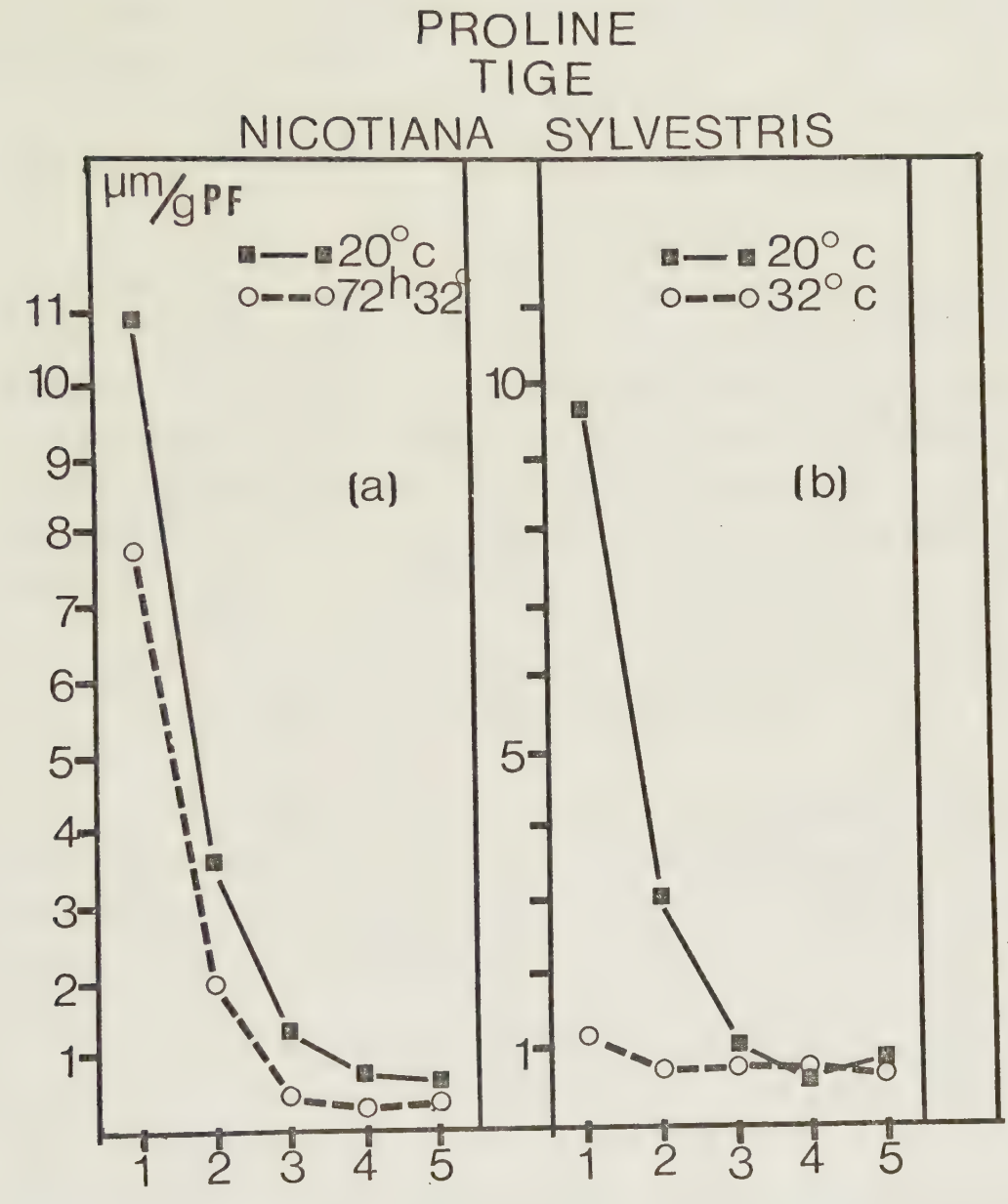


Fig. I6 : Gradient de proline le long de la tige de Nicotiana sylvestris.

- a) floral à 20°C et après 72 h de transfert à 32°C.
- b) floral à 20°C et après transfert à 32°C au stade végétatif.

- En fonction de la photopériode :

Une expérience identique à la précédente est effectuée à 20°C en jours longs et après 72 heures de passage en jours courts. Les plantes, au moment de leur passage en jours courts, sont florales, c'est-à-dire qu'elles portent des boutons floraux de l'ordre de 2 à 5 millimètres de long.

Les prélèvements sont faits tous les trois entre-noeuds depuis le bourgeon terminal.

La figure n° I7 montre qu'il existe,aussi bien en jours longs qu'en jours courts, un gradient de proline libre le long de la tige. De plus, trois nuits longues suffisent pour provoquer une diminution de la teneur en proline dans les tissus proches du bourgeon terminal, mais cette diminution est toujours moins importante que chez *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. Remarquons en outre que les concentrations en proline sont,aussi,toujours plus grandes quel que soit le niveau de la tige que l'on a prélevé.

Quant aux autres acides aminés, ils ne subissent que peu de variations suivant la photopériode ; seule la glutamine présente des différences entre jours courts et jours longs.

En conclusion, il n'apparait pas de différence entre *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. et *Nicotiana sylvestris*. Quelles que soient les conditions, il existe un gradient de proline le long de la tige de ces tabacs.

Chez *Nicotiana sylvestris*, alors qu'il n'existe pas de "gradient de propension à la floraison", il y a un gradient de proline aussi bien en eupériode qu'en dyspériode. Si la proline libre joue un rôle quelconque dans les processus de mise à fleurs, elle apparait ici comme un facteur nécessaire ou limitant, mais non comme facteur suffisant.

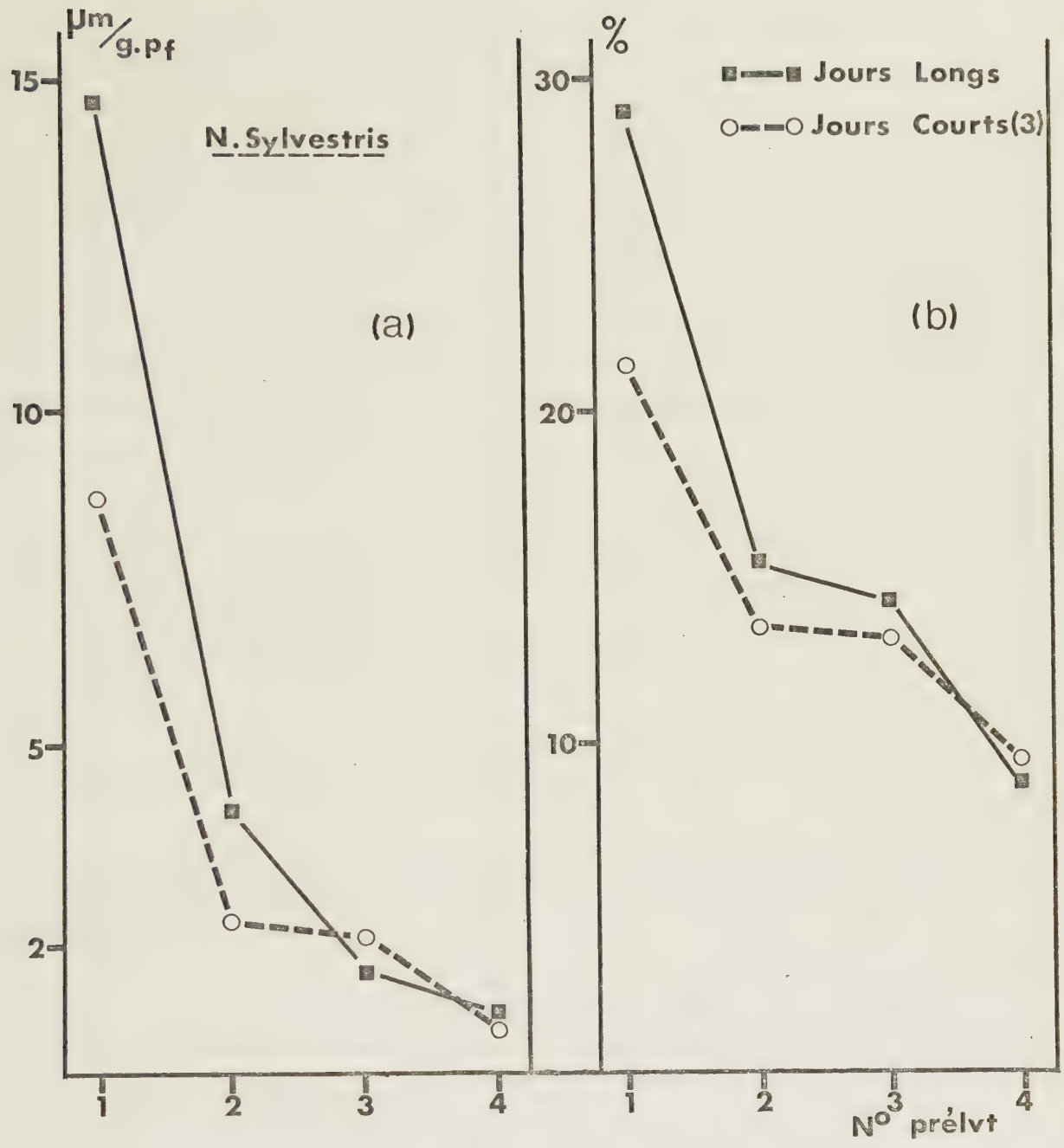


Fig. I7 : Gradient de proline le long de la tige de Nicotiana sylvestris maintenu en jours longs ou après 3 jours courts.

- a) teneur en micromoles par gramme de poids frais.
- b) pourcentage de proline par rapport au total des acides aminés libres.

Ajoutons que la teneur en proline libre ainsi que son pourcentage par rapport aux autres acides aminés est plus importante chez *Nicotiana sylvestris*. Apparemment la proline serait beaucoup plus un facteur limitant pour *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c., ou plus généralement, pour des *Nicotiana* préférants ou indifférents que pour des *Nicotiana sylvestris* photopériodiques.

Après avoir déterminé les conditions de ces modifications de contenu en proline libre dans les feuilles et la tige du tabac, il fallait étudier son devenir dans l'inflorescence lors de l'épanouissement des fleurs.

D - ANALYSE COMPAREE ENTRE 20°C ET 32°C DES DIFFERENTES PARTIES D'UNE FLEUR.

Plusieurs essais ont été effectués suivant le stade de la fleur et le moment du passage à 32°C.

Analyse des différents tissus de la fleur avant la déhiscence des anthères.

Il est nécessaire d'analyser les étamines avant que les grains de pollen ne soient dispersés. Pour cela, on prélève les fleurs avant la déhiscence des anthères, c'est-à-dire à un stade voisin du début de l'épanouissement de la fleur.

Une partie d'un lot de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. est placée à 20°C, l'autre à 32°C. Les tabacs, placés à 32°C, ont leurs ébauches florales formées et visibles à l'oeil nu (boutons de l'ordre du millimètre) au moment de leur passage à cette température.

Les prélèvements sont faits au bout de 8 jours. On a analysé séparément :

- pétales et sépales
- étamines
- pistils

La figure n° 18, montre que la majeure partie de la proline présente dans l'inflorescence, se trouve dans les étamines et ceci aussi bien à 20° qu'après un séjour à 32°C, on ne note, en effet, aucune chute du contenu en proline au niveau des étamines à 32°C. Le tableau n° 8, révèle qu'à cette même température de 32°C, on observe une accumulation très importante des deux amides. Tous les autres acides aminés se trouvent également en quantité plus importante et particulièrement les leucines, la tyrosine, le tryptophane et l'histidine.

Au niveau du pistil, par contre, on observe une chute importante du contenu en proline après un séjour à 32°C. Sa teneur est alors dix fois moindre ;quant aux autres acides aminés les variations entre les deux températures sont faibles.

Dans les pétales et les sépales, on retrouve la même chute du contenu en proline à 32°C. Les autres acides aminés sont un peu plus fortement représentés à 32°C et particulièrement comme dans les étamines : les amides, la tyrosine ainsi que les acides aminés basiques.

Ces résultats confirment donc l'importance de cet acide aminé dans les étamines et sans doute dans les grains de pollen comme cela a été démontré par TUPY (1961), BRITIKOV et ses collaborateurs (1965), LINDER et COUSTAUT (1966) ainsi que par un grand nombre d'auteurs travaillant sur les modifications biochimiques accompagnant la stérilité mâle, citons en particulier : FUKASAWA (1954), FUZISHITA (1964) et ZOLOTOVITCH (1970).

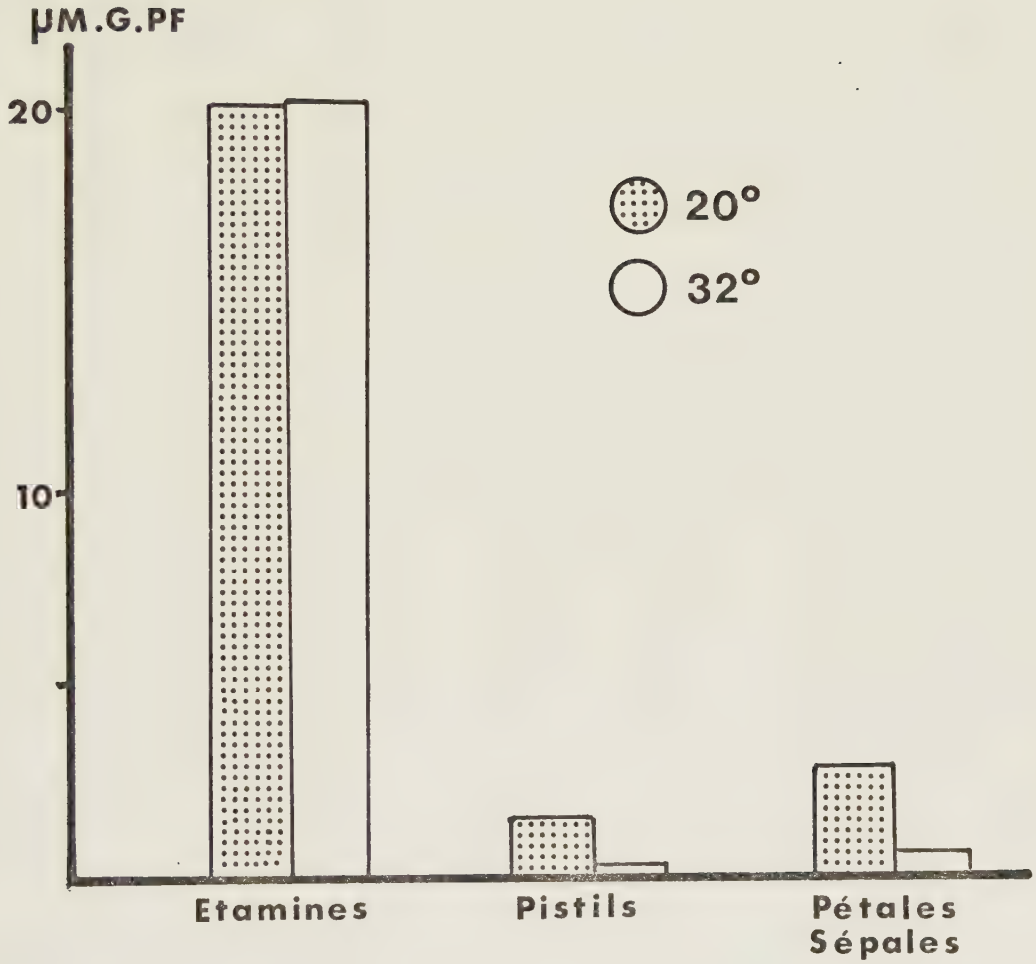


Fig. I8 : Comparaison entre 20°C et 32°C des teneurs en proline libre des différentes parties de la fleur de Nicotiana tabacum var. Xanthi n.c.

	ETAMINES		PISTILS		PETALES SEPALES	
	20°C	32°C	20°C	32°C	20°C	32°C
ASP.	1,03	1,46	3,87	2,97	0,97	1,36
ASP.NH_2	6,05	24,10	4,07	8,09	1,83	6,50
THR.	1,08	2,32	0,81	0,70	0,32	0,50
SER.	2,34	3,32	2,72	2,07	1,31	1,09
GLU.	2,83	2,98	4,21	3,59	1,31	2,09
GLU.NH_2	3,61	17,41	4,38	4,40	2,54	6,60
PRO.	20,21	20,32	1,30	0,11	2,88	0,61
CIT.	Traces	-	-	-	-	-
GLY.	8,27	0,65	0,14	0,13	0,12	0,12
ALA.	2,12	3,09	1,05	1,10	0,67	0,60
VAL.	0,60	1,80	0,24	0,20	0,13	0,17
CYS.	0,05	Traces	-	-	-	-
MET.	Traces	-	-	-	-	-
ILEU.	0,36	1,10	0,09	0,13	0,07	0,14
LEU.	0,34	1,16	0,28	0,23	0,15	0,18
TYR.	0,41	2,94	0,07	0,18	0,05	0,22
PHE.	0,33	0,33	0,21	0,18	0,16	0,21
ORN.	0,06	0,07	0,07	0,06	-	0,05
LYS.	0,41	1,14	0,22	0,23	0,10	0,26
TRY.	0,52	1,58	0,40	0,47	0,14	0,26
HIS.	0,51	1,74	0,17	0,28	0,05	0,20
ARG.	0,36	0,59	0,08	0,11	0,05	0,17

TABLEAU N° 8 : Comparaison, entre 20°C et 32°C, des teneurs en acides aminés libres (en micro-moles par gramme de poids frais) des différentes parties de la fleur de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c.

Ces divers auteurs ont signalé l'importance de la proline dans le pollen fertile et son absence ou sa faible teneur en cas de stérilité. En contre partie, ils notent pour la plupart, une teneur accrue en asparagine dans les tissus mâles stériles.

Du reste lorsque le passage à 32 °C de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi est effectué juste après l'induction florale, les fleurs qui s'épanouissent à cette température sont stériles par absence de pollen.

Nous pouvons donc résumer ainsi les principaux résultats obtenus (tableau n° 9) :

- à 20°C, la proline libre s'accumule dans le bourgeon terminal, les jeunes feuilles et la tige correspondante de divers *Nicotiana* au fur et à mesure que se déroulent les processus physiologiques de la floraison.

- à 32°C, température inhibant la floraison, les tissus gardent une teneur faible et relativement constante. Un simple séjour de 72 heures à cette température suffit à abaisser notablement la teneur en proline libre de plantes à fleurs élevées préalablement à 20°C. Ceci est vrai essentiellement pour *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. ou *Nicotiana tabacum* var. Samsun, plantes plutôt indifférentes à la photopériode. Pour les variétés photopériodiques (*Nicotiana sylvestris*), le séjour à 32°C retarde la mise à fleurs mais ne l'inhibe pas ; dans ces plantes, la teneur en proline présente des variations moins importantes après passage à cette température. En outre, le passage en dyspériode modifie aussi profondément le contenu de cet acide aminé.

		NICOTIANA XANTHI n.c.			NICOTIANA SYLVESTRIS
		VEGETATIF	PREFLORAL	FLORAL	FLORAL
20°C jours longs	"APEX"	-	++	+++++	++++
	TIGE	-	+++++	+++	++++
	Feuilles	-	++++	+	++++
32°C 72 h. jours longs	"APEX"	-	+	++	++
	TIGE	-	+	++	++
	Feuilles	-	+	+	++
20°C 72 h. jours courts	"APEX"				+
	TIGE				++
	Feuilles				+

TABLEAU N° 9 : Importance relative de la proline libre dans différents tissus du "sommet" de divers *Nicotiana* suivant le stade et les conditions favorables ou non à la mise à fleurs.

+++++	plus de 35 % du total des acides aminés libres
++++	de 25 à 30 %
+++	de 20 à 25 %
++	de 10 à 20 %
+	de 5 à 10 %
-	moins de 5 %

- il existe, parallèlement au "gradient de propension à la floraison", tel qu'il a été défini par AGHION-PRAT (1965), un gradient de proline le long de la tige de ces divers *Nicotiana*, gradient fortement perturbé après passage sous des conditions défavorables à la mise à fleurs.

- avant l'épanouissement des fleurs, la proline libre est principalement localisée dans les jeunes feuilles et la tige correspondante. C'est aussi à leur niveau que se produit la chute de teneur consécutive au passage en conditions d'inhibition de floraison.

- au moment de l'épanouissement des fleurs, la proline est localisée essentiellement dans le bourgeon terminal, les jeunes feuilles n'en renferment que de faibles quantités. A ce moment, le passage en conditions défavorables à la mise à fleurs n'affecte plus guère que la proline située dans le bourgeon terminal et la portion de tige située en dessous.

- au niveau du "bourgeon terminal", la proline libre s'accumule préférentiellement dans les étamines et les grains de pollen.

Ces différences importantes de teneurs en proline libre entre les stades végétatifs et floraux peuvent avoir plusieurs causes ; il peut s'agir :

- soit d'une synthèse accrue de cet acide aminé au fur et à mesure du développement, synthèse plus importante en vue de son stockage et de son utilisation au niveau des grains de pollen.

- soit d'une synthèse différente de protéines suivant le stade.

- soit d'une protéolyse plus importante au moment de la floraison.

De même l'importante chute du contenu en proline, après un séjour de la plante en conditions défavorables au bon déroulement des processus de mise à fleurs, peut avoir pour origine :

- soit une inhibition de synthèse.

- soit une orientation du métabolisme vers d'autres voies, en particulier, vers les amides par oxydation de cet acide aminé.

- soit une augmentation de synthèse protéique ou même une synthèse de protéines différentes.

Quoiqu'il en soit, ceci ne veut pas dire que la proline libre joue un rôle direct au niveau des processus physiologiques de la floraison. Cependant elle est en quelque sorte, le témoin de profondes modifications biochimiques accompagnant le passage à l'état de reproduction.

Dans la suite de notre travail, nous avons d'abord cherché à déterminer si ces changements n'étaient pas le reflet d'une incorporation différente au niveau protéique, donc d'une synthèse ou d'un turn-over différent de certains groupes protéiques.

CHAPITRE III

ETUDE DU METABOLISME DE LA PROLINE EN FONCTION DU DEVELOPPEMENT ET DE LA TEMPERATURE

Dans ce chapitre, nous allons étudier l'incorporation de la proline dans les protéines suivant le stade de la plante et la température. Dans une deuxième partie nous comparerons ces résultats avec ceux obtenus à l'aide d'autres acides aminés radioactifs ; nous avons utilisé d'abord des acides aminés proches de la proline, à savoir l'acide glutamique et l'arginine, et enfin un acide aminé considéré comme un bon marqueur de la synthèse protéique, la leucine.

A - METABOLISME DE LA PROLINE ^{14}C (U)

Cet élément radioactif est fourni à la plante de deux façons : soit seul, soit accompagné de glucose froid pour éviter de créer certaines perturbations dans l'équilibre métabolique des tissus utilisés.

a) Absorption de proline ^{14}C seule (VALLEE et PERDRIZET, 1971).

Durant la phase végétative. Les premières expériences ont été effectuées avec des *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. végétatifs (50 à 55 jours) ayant séjourné en permanence à 20°C d'une part, et des plantes du même lot, élevées à 20°C, mais transférées 72 heures avant l'essai à 32°C, d'autre part.

Les incorporations de L proline ^{14}C, uniformément marquée (U), sont faites à 20°C comme à 32°C sur les sommets de tabacs durant 6 heures.

Les résultats sont exprimés soit en nombre de coups par minute, soit en pourcentage du total de la radioactivité comptée.

Au cours des premiers essais, nous avons fait les bilans complets, c'est-à-dire que nous avons compté toutes les fractions issues des diverses extractions ; par la suite nous nous sommes limités uniquement aux fractions sucres et acides organiques, acides aminés libres et protéiques. La phase lipophyle ainsi que la baryte utilisée pour fixer le gaz carbonique n'ont pas été retenues dans la plupart des essais. Une très faible proportion de la radioactivité donnée se retrouve dans ces deux phases.

	20°C		32°C (72 h.)	
	nombre de coups par minute	% du total de la radioactivité comptée	nombre de coups par minute	% du total de la radioactivité comptée
Sucres et Ac. organiques	194 000	10,92	227 000	14,11
A. A. libres	214 900	12,09	159 740	9,93
Protéines	1 367 550	76,98	1 221 150	75,94
Total	1 776 450	99,99	1 607 890	99,98

TABLEAU N° 10 : Répartition de la radioactivité entre les différentes fractions extraites des feuilles et de la tige après fourniture de proline ^{14}C (U), chez *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c., au stade végétatif à 20°C et après un séjour à 32°C.

Il n'apparaît pas, à l'examen du tableau n° 10, de différences significatives entre 20°C et après transfert à 32°C, dans l'ensemble tige et feuilles. La radioactivité fournie est très largement intégrée dans les protéines sans différence entre les deux températures. La fraction sucres et acides organiques est légèrement plus marquée à 32°C. En outre, on ne retrouve qu'un faible pourcentage de radioactivité dans les acides aminés libres ; il y a eu durant les 6 heures de l'expérience, une forte utilisation de la proline.

La répartition de la radioactivité entre les divers acides aminés libres et protéiques est donnée par le tableau n° 11.

Il en ressort que la plus grande partie de la proline ^{14}C donnée est intégrée, sous cette forme, dans les protéines des feuilles et de la tige et sans différence importante entre les deux températures. A côté de la proline, quelques autres acides aminés sont radioactifs ; en particulier, les composés les plus proches de cet acide aminé, c'est-à-dire l'acide glutamique et son amide, l'acide aspartique et l'hydroxyproline, mais il n'apparaît pas de différence importante entre 20°C et 32°C.

Notons seulement que les acides aminés protéiques sont un peu plus radioactifs à 32°C, alors que les libres le sont plus à 20°C.

En conclusion, nous voyons que, pendant la phase végétative, la proline, dans la tige comme dans les feuilles, à 20°C comme après 72 heures à 32°C, est principalement utilisée pour la synthèse protéique.

Durant la phase florale. Une expérience semblable est effectuée, dans les mêmes conditions entre 20°C et après 72 heures à 32°C sur des *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. en voie de floraison (boutons floraux de l'ordre de 2 à 5 mm.).

	20°C Tige		32°C	
	nombre de coups par minute	% par rapport à la radioactivité comptée	nombre de coups par minute	% par rapport à la radioactivité comptée
Protéines				
ASP.	1 400	0,08	2 500	0,16
GLU.	10 500	0,59	12 000	0,78
PRO.	353 000	19,90	238 000	15,50
OHPRO.	61,350	3,45	26 000	1,69
A.A. libres				
ASP.	9 550	0,53	2 450	0,16
GLU.	36 450	2,05	12 600	0,82
GLU.NH_2	5 900	0,33	1 900	0,08
PRO.	22 750	1,28	8 250	0,53
ALA.	-	-	Traces	-
γ.NH_2BUT.	3 600	0,20	800	0,05
	Feuilles			
Protéines				
ASP.	Traces	-	2 100	0,14
GLU.	19 800	1,10	59 800	3,70
PRO.	894 300	50,40	856 600	55,80
OH.PRO.	27 200	1,53	24 100	1,51
A.A. libres				
ASP.	3 100	0,18	3 200	0,21
GLU.	63 400	3,57	75 550	4,93
GLU.NH_2	5 550	0,31	4 550	0,30
PRO.	52 600	2,96	30 350	1,98
ALA.	5 000	0,28	3 800	0,25
γ.NH_2.BUT.	7 000	0,39	6 300	0,41

TABLEAU N° 11 : Répartition de la radioactivité entre les divers acides aminés libres et protéiques de la tige et des feuilles de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c., végétatif à 20°C et après 72 h. à 32°C, suivant la fourniture de proline ^{14}C (U).

Le nombre de coups par minute et le pourcentage de radioactivité (tableau n° 12) mesurés au niveau protéique à 20°C sont très abaissés par rapport à ce que l'on trouve dans les sommets végétatifs et cette diminution est due à une moindre utilisation pour la synthèse protéique : plus de 55 % de la radioactivité comptée se trouve dans la fraction aminée soluble.

Par contre, après transfert à 32°C, la quantité intégrée sous forme protéique, tout en étant inférieure à celle trouvée dans les tissus végétatifs représente néanmoins une forte proportion (44 %) de la radioactivité totale. Les acides aminés libres n'en renferment plus que 21 %.

Un séjour à 32°C, parallèlement à l'inhibition de floraison qu'il induit, redonne aux tissus de la plante un métabolisme de type végétatif.

Comme précédemment pour les plantes végétatives, la fraction sucres et acides organiques est plus radioactive à 32°C.

	20°C		32°C	
	nombre de coups par minute	% du total de la radioactivité comptée	nombre de coups par minute	% du total de la radioactivité comptée
sucres et ac. organiques	170 500	14,29	262 250	19,13
A.A. libres	662 325	55,52	289 498	21,12
protéines	228 200	19,13	600 750	43,83
radioactivité totale dans les boutons floraux.	131 800	11,04	217 948	15,90
Total	1 192 825	99,38	1 370 446	99,98

TABLEAU N° 12 : Répartition de la radioactivité entre les diverses fractions extraites de la tige et des feuilles de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. au stade floral, à 20°C et après 72 heures à 32°C, après fourniture de proline ^{14}C (U).

Ceci témoigne d'un métabolisme plus actif aux températures supérieures.

Alors qu'il était difficile d'analyser la répartition de la radioactivité située dans le bourgeon terminal des plantes végétatives, ici nous détectons une proportion importante de la radioactivité donnée dans les boutons floraux. L'analyse des fractions acides aminés donne les mêmes résultats que dans les feuilles, à savoir, à 20°C par exemple, une faible radioactivité dans les protéines et une plus forte dans les acides aminés libres.

L'examen du tableau n° 13 confirme ces résultats sur les tiges et les feuilles de tabacs floraux : il y a une moindre incorporation de proline dans les protéines à 20°C par rapport aux plantes végétatives, alors qu'un séjour à 32°C redéclenche une forte intégration, aussi bien dans les tiges que dans les feuilles.

La proline libre dont la teneur augmente dans les plantes à 20°C et diminue après passage à 32°C, est très radioactive à 20°C, environ 10 % dans les feuilles et 20 % dans les tiges ; après 72 heures à 32°C, on ne retrouve plus que 0,8 % dans les feuilles et 6,3 % dans les tiges.

Il apparaît enfin que les mêmes acides aminés sont radioactifs entre les stades végétatifs et floraux. Cependant, alors qu'après passage à 32°C, on avait noté une augmentation des teneurs en amides, la radioactivité de ces dernières n'est pas modifiée significativement. La proline libre dont la teneur diminue après passage à 32°C, ne paraît pas se transformer en amides dans ces conditions.

Donc, lors du passage de l'état végétatif à l'état reproducteur, la teneur en proline libre augmente dans les tissus du sommet de la plante et, cette variation est corrélative d'une modification de son incorporation dans les protéines.

	20°C	TIGE	32°C	
	nombre de coups par minute.	% de la radioactivité totale comptée	nombre de coups par minute.	% de la radioactivité totale comptée
Protéines				
ASP.	I 300	0,I0	2 500	0,I8
GLU.	I7 300	I,45	22 500	I,64
PRO.	5I 800	4,34	I76 300	I2,86
OH PRO.	3 250	0,27	I6 I50	
A.A. libres				
ASP.	I7 500	I,47	I0 I25	0,74
GLU.	45 600	3,82	60 825	4,43
GLU.NH_2	90 562	7,60	3I 900	2,32
PRO.	264 800	22,20	86 I75	6,28
ALA.	2 I40	0,I8	-	-
γ.NH_2BUT.	I9 950	I,67	6 525	0,47

FEUILLES

Protéines				
ASP.	900	0,07	I 550	0,II
GLU.	25 950	2,I7	6I 350	4,47
PRO.	I25 000	I0,47	3I5 850	23,05
OH PRO.	2 700	0,22	4 550	0,33
A.A. libres				
ASP.	2 475	0,2I	2 2I2	0,I5
ASP.NH_2	-	-	825	0,06
GLU.	86 850	7,28	63 490	4,63
GLU.NH_2	7 387	0,6I	6 525	0,47
PRO.	II2 875	9,46	II I00	0,8I
ALA.	2 025	0,I7	I 387	0,I0
γ.NH_2BUT.	I0 I62	0,85	8 400	0,6I

TABLEAU N° I3 : Répartition de la radioactivité entre les divers acides aminés libres et protéiques de la tige et des feuilles de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c., floral, à 20°C et après 72 heures à 32°C, après fourniture de proline $^{I4}C(U)$.

De même, la baisse de teneur en proline libre, consécutive à un passage de 72 heures à 32°C, chez *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. induit, est presque exclusivement due à une utilisation plus importante de cet acide aminé au niveau protéique, redonnant ainsi aux tissus un métabolisme voisin de celui que l'on observe dans les tissus de tabacs végétatifs.

Nous avons résumé à l'aide d'histogramme (figure n° 19, a et b) les principaux résultats obtenus.

Cependant, compte-tenu des travaux de BIDWELL, STEWARD et BARR (1964) sur la compartimentation métabolique entre acides aminés libres et protéiques, ainsi que des travaux de DOUGALL (1965, 1966) sur la compétition isotopique, il apparaît utile de vérifier si le fait de fournir un acide aminé seul, ne provoque pas de perturbations dans l'équilibre métabolique de la plante.

En effet, selon BIDWELL et ses collaborateurs, le pool des acides aminés protéiques serait distinct de celui des acides aminés libres ; ces derniers ne seraient que des produits issus de la protéolyse. En outre, DOUGALL (1965) a étudié le marquage des acides aminés protéiques en fournissant du glucose ^{14}C et un acide aminé non radioactif. Il a ainsi montré que, pour un certain nombre d'acides aminés, le résidu protéique correspondant est radioactif.

C'est donc le glucose qui a servi de précurseur. Dans le cas de la proline (DOUGALL, 1966), il ne trouve pas de radioactivité dans la proline protéique, le précurseur de la proline protéique a donc été la proline fournie. En outre, la concentration en acides aminés fournis a une grande importance.

Pour ces motifs, nous avons répété l'expérience précédente sur un tabac végétatif et un tabac floral à 20°C, en fournissant en même temps que la proline ^{14}C, du glucose non radioactif à une concentration voisine de ce que l'on trouve dans ces tissus (ayant habituellement dans ces tissus 3 à 5 mg de glucose par gramme de poids frais, on a donné pour 4,5 grammes de poids frais, 20 mg de glucose).

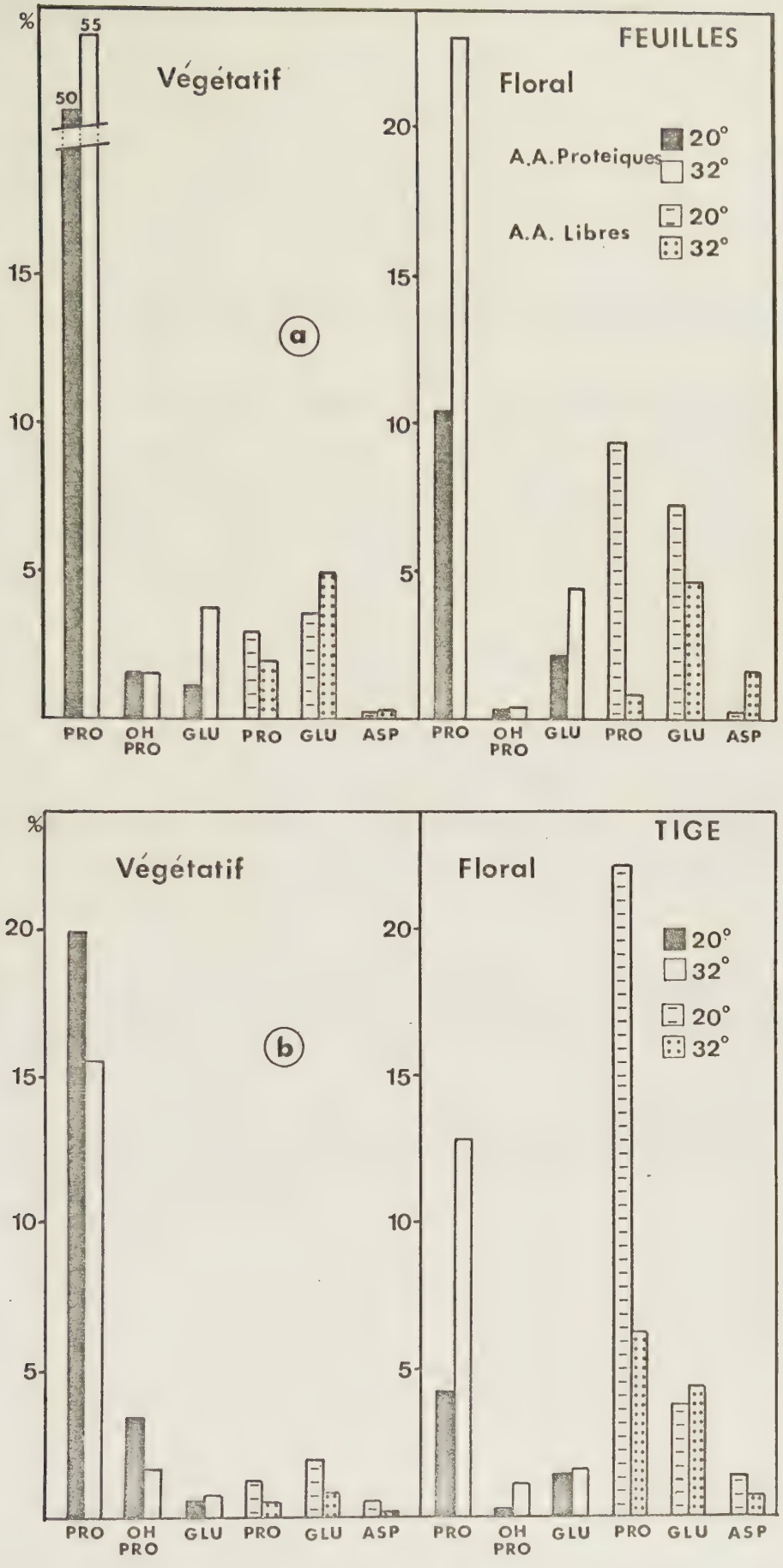


Fig. I9 : Après fourniture de proline ^{14}C, pourcentage de radioactivité dans divers acides aminés libres et protéiques de feuilles (a) et de tige (b) de Nicotiana tabacum var. Xanthi n.c. végétatif ou floral, à 20°C ou après 72 heures de transfert à 32°C.

b) Utilisation de proline ^{14}C fournie avec du glucose.

On donne à des sommets de tabacs, végétatifs et floraux élevés à 20°C, 25 µCi de L-proline ^{14}C (U) et 10 mg de glucose. Lorsque la solution est absorbée (1 heure), on fournit durant le temps de l'expérience une solution de glucose à 5 mg/ml. De ce fait, les tissus en ont absorbé entre 20 et 25 mg.

Le tableau n° 14 montre qu'il n'existe pas de modification par rapport aux résultats précédents.

Les différences observées sont accrues, mais ceci est du principalement au stade des plantes employées ; si l'expérience est effectuée avant l'apparition des boutons floraux, les variations sont plus importantes qu'avec des plantes dont les boutons sont visibles. Il faut noter :

- l'importance de l'intégration au niveau protéique durant la phase végétative et la faible radioactivité dans les acides aminés libres.
- la diminution très importante de la radioactivité des protéines au moment de la floraison, la fraction aminé soluble étant, au contraire, très radioactive.

	Végétatif 20°C		Floral 20°C	
	nombre de coups par minute.	% du total de la radioactivité comptée	nombre de coups par minute.	% du total de la radioactivité comptée
Sucres et Ac. organiques	I46 750	8,I7	283 750	I7,49
A.A. libres	63 620	3,6I	85I 820	52,50
Protéines	I 585 520	88,I7	485 780	29,95
Total	I 795 990	99,95	I 62I 350	99,94

TABLEAU N° I4 : Répartition de la radioactivité entre les diverses fractions extraites de la tige et des feuilles de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c., au stade végétatif et floral à 20°C, après fourniture de proline ^{I4}C et de glucose froid.

L'examen du tableau n° I5 confirme ces résultats. Mais, nous voyons en outre que divers acides aminés libres sont très radioactifs dans les tissus de la plante florale. Même dans ces tissus, mis à part la proline, le nombre de coups par minute comptés dans les acides aminés protéiques est plus important que dans ceux des tissus végétatifs.

L'intégration de la proline dans les protéines de tabac est très différente suivant que les plantes sont végétatives (ou rendues telles par passage en conditions défavorables) ou en voie de reproduction.

En fonction de ces résultats, on peut d'abord se poser une question : les différences observées au niveau de l'incorporation

TIGE

	Végétatif		Floral	
	nombre de coups par minute.	% de la radio-activité tota-le comptée	nombre de coups par minute.	% de la radio-activité tota-le comptée
Protéines				
ASP.	-	-	3 800	0,23
GLU.	3 640	0,26	7 600	0,47
PRO.	244 580	I3,93	I8 240	I,I2
OH PRO.	27 300	I,55	3 990	0,23
A.A. libres				
ASP.	480	0,02	I4 440	0,88
GLU.	2 I00	0,II	40 090	2,47
GLU.NH_2	700	0,04	I9 570	I,20
PRO.	2 940	0,I7	I56 750	9,70
ALA.	700	0,04	950	0,06
γ.NH_2BUT.	-	-	3 420	0,2I

FEUILLES

Protéines				
ASP.	2 550	0,I4	6 300	0,39
GLU.	2I 900	I,24	93 625	5,78
PRO.	I 239 450	70,06	3I7 625	I9,59
OH.PRO.	39 600	2,25	7 875	0,49
A.A. libres				
ASP.	I 500	0,08	I5 225	0,94
ASP.NH_2	I 050	0,06	22 925	I,43
GLU.	I0 500	0,60	208 250	I2,85
GLU.NH_2	I 500	0,08	I9 950	I,I9
PRO.	22 950	I,3I	33I 275	20,40
ALA.	I6 800	0,96	I4 350	0,88
γ.NH_2BUT.	I 200	0,07	2 800	0,I7

TABLEAU N° I5 : Répartition de la radioactivité, après absorption de proline $^{14}C(U)$ et de glucose froid, dans les divers acides aminés libres et protéiques de la tige et des feuilles de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c., végétatif et floral à 20°C.

dans les protéines ne sont-elles pas le reflet des teneurs en proline libre suivant le stade de développement de la plante ? En d'autres termes, dans les tissus végétatifs où il y a peu de proline, la fourniture de proline radioactive n'est-elle pas relativement plus importante que dans les tissus de plantes florales, déjà naturellement très riches en cet acide aminé ?

S'il en est ainsi, l'incorporation de cet acide aminé dans les protéines, en admettant que la vitesse de synthèse protéique soit la même, ne représente-t-elle pas que le rapport, $\frac{\text{proline non radioactive}}{\text{proline radioactive}}$ rapport faible dans le végétatif, élevé dans le floral ?

Pour tenter de vérifier cette hypothèse, nous avons effectué une série d'expériences identiques aux précédentes en fournissant de la proline ^{14}C (U) au moment de l'induction florale, c'est-à-dire au moment où débute l'accumulation de proline libre.

Une telle expérience permet de savoir si l'incorporation de proline dans les protéines est de moins en moins importante au fur et à mesure que s'accumule la proline libre ou s'il y a, à un moment déterminé, un changement brutal d'incorporation. Dans ce cas, les variations observées entre les stades végétatifs et floraux ne seraient pas le reflet de la teneur en proline libre, donc d'une simple dilution de l'élément radioactif, mais le témoin d'un changement profond du métabolisme au cours du développement.

c) Répartition de la proline ^{14}C dans diverses fractions extraites suivant l'âge et le stade de la plante.(VALLEE, MARTIN, PERDRIZET, VANSUYT et PREVOST, 1972 b).

Pour cette étude, les *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. élevés en serre jusqu'à l'âge de 40 jours sont transférés dans les salles climatisées à 20°C et 32°C. Dans ces conditions, la transformation du méristème végétatif survient entre le 60ème et le 65ème jour ; les boutons floraux sont visibles au 85ème jour (boutons de

l'ordre du mm).

On donne la proline ^{14}C (U) à des sommets de tabacs en fonction de leur âge, tous les 2, 3 ou 6 jours, à 20°C comme à 32°C.

Les extractions et les dosages sont faits sur l'ensemble tige et feuilles.

Pour cette expérience, la radioactivité a été déterminée de deux façons différentes :

- Une fraction aliquote de chaque solution à doser est déposée dans un tube à scintillation auquel on ajoute 10 ml d'Instagel ; elles sont comptées à l'aide d'un scintillateur PACKARD.

- La radioactivité de chaque acide aminé est déterminée par passage d'une fraction aliquote de l'éluat de la colonne Technicon à travers une cellule à cristaux d'anthracène située entre les deux photomultiplicateurs du compteur. Cette technique permet d'obtenir une valeur relative de la radioactivité de chaque acide aminé par rapport au total de la radioactivité placée sur la colonne.

Un certain nombre de résultats intéressants ressortent de cette expérience.:

- Dans les fractions globales solubles, insolubles... (tableau n° 16) que les résultats soient exprimés en coups par minute ou en pourcentage de la radioactivité totale comptée, les valeurs trouvées à 20°C pour les acides aminés libres et protéiques confirment nos précédents résultats : on observe, en effet, que les tissus de plantes végétatives (58 et 60 jours) incorporent la proline ^{14}C dans les protéines en grande quantité, alors que, dans les plantes florales (85 jours), cette intégration est faible. Dans ces tissus, la radioactivité se trouve dans les acides aminés libres.

	Acides aminés libres	Fraction insoluble	Sucres, Ac. organiques	Substances lipophyles
A 20°C				
58ème jour	2 166 000	9 110 080	475 000	342 500
	(17,91)	(75,33)	(3,92)	(2,83)
60ème jour	1 872 585	8 671 575	502 000	270 000
	(16,54)	(76,6)	(4,4)	(2,4)
63ème jour	2 177 070	8 154 820	426 000	215 000
	(19,8)	(74,3)	(3,9)	(1,9)
65ème jour	4 558 140	7 420 410	656 000	465 000
	(34,8)	(56,6)	(5,0)	(3,5)
67ème jour	7 027 920	3 825 840	1 514 000	336 000
	(55,3)	(30,1)	(11,9)	(2,6)
69ème jour	6 637 800	3 867 600	728 000	189 000
	(58,11)	(33,8)	(6,4)	(1,6)
72ème jour	8 758 000	1 286 440	582 000	184 600
	(81,0)	(11,9)	(5,4)	(1,7)
74ème jour	9 793 350	1 132 110	508 000	210 000
	(84,1)	(9,7	(4,3)	(1,8)
79ème jour	10 396 100	1 529 800	650 000	248 500
	(81,07)	(11,9)	(5,1)	(1,9)
85ème jour	10 908 350	2 448 600	1 944 000	392 000
	(69,5)	(15,6)	(12,4)	(2,5)
A 32°C				
60ème jour	724 675	10 741 385	490 000	440 000
	(5,8)	(85,8)	(3,9)	(3,5)
65ème jour	865 095	11 841 000	852 000	536 000
	(6,1)	(84,0)	(6,0)	(3,8)
69ème jour	1 055 610	11 377 500	1 082 000	581 000
	(7,5)	(80,7)	(7,7)	(4,1)
79ème jour	856 000	10 484 000	1 446 000	700 500
	(6,3)	(77,1)	(10,7)	(5,2)

TABLEAU N° I6 : Répartition en coups par minute et en pourcentage (....) de la radioactivité totale comptée dans diverses fractions extraites de la tige et des feuilles de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c., suivant l'âge et la température.
(Elément radioactif donné I0 µCi de proline ^{14}C (U).

Cependant, entre ces deux extrêmes, il n'y a pas un changement progressif de l'incorporation de la proline au fur et à mesure que l'on évolue du stade végétatif au stade floral, mais, un changement relativement rapide entre le 63ème et le 72ème jour. Nous savons que cette période correspond à l'induction florale chez *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. dans les conditions décrites. Au cours de cette même période, les acides aminés libres, faiblement radioactifs au stade végétatif, le sont de plus en plus à partir du 63ème jour pour atteindre un maximum au 72ème jour.

La diminution de la radioactivité des protéines est compensée par l'augmentation de la radioactivité des acides aminés libres.

Les autres fractions analysées, c'est-à-dire les sucres et les acides organiques, ainsi que les substances lipophyles ne présentent pas de variations significatives. Seuls les sucres et les acides organiques à deux périodes différentes sont deux fois plus radioactifs : au 67ème jour et au 85ème jour. Correspondent-ils à un besoin particulier de composés carbonés à un moment précis de l'induction ainsi qu'à l'apparition des fleurs ?

Pour les plantes restées à 32°C, c'est-à-dire dans des conditions où les tabacs restent à l'état végétatif, aucun changement n'apparait dans la radioactivité des acides aminés libres et protéiques (tableau n° I6).
Quel que soit l'âge de la plante, il y a toujours à cette température une forte intégration de la radioactivité dans les protéines, alors que les acides aminés libres le sont très peu.

La figure n° 20 qui représente les pourcentages de radioactivité de fractions aminés solubles et insolubles, résume de façon explicite ces divers résultats.

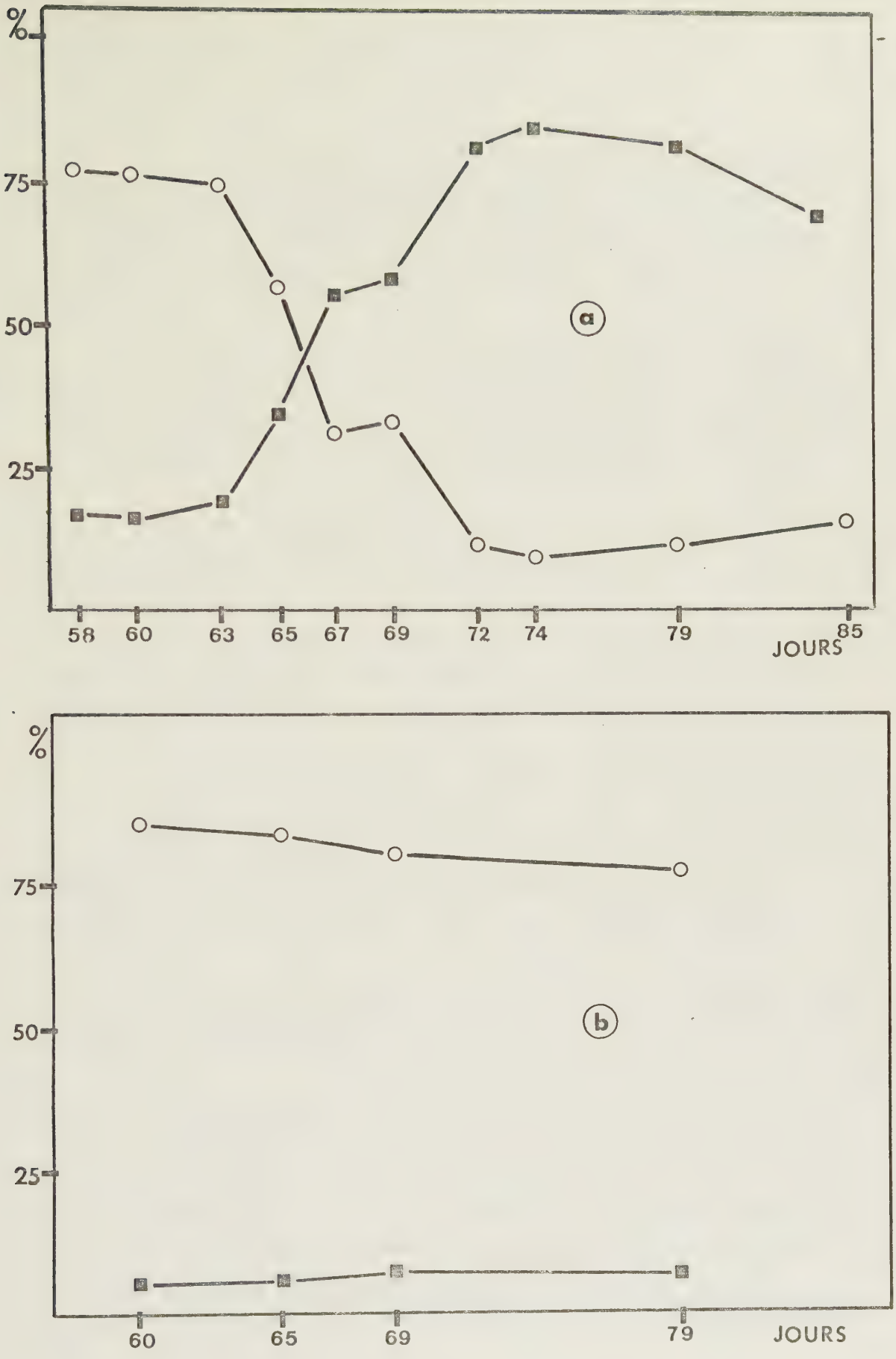


Fig. 20 : Répartition de la radioactivité dans la fraction acides aminés libres (■—■) et protéiques (○—○) extraite du sommet de Nicotiana tabacum var. Xanthi n.c. en fonction du temps.

- a) plantes élevées à 20°C.
- b) plantes élevées à 32°C.

- Si on examine à présent, les résultats des dosages d'acides aminés libres et protéiques ainsi que leur radioactivité, nous retrouvons au niveau de la proline des résultats analogues à ceux que l'on avait observés sur les fractions globales.

Après 6 heures de métabolisme, quelques acides aminés libres sont devenus radioactifs : ce sont les acides aspartique et glutamique, les amides et l'acide γ amino butyrique ; quelques traces de radioactivité sont détectables dans la thréonine et l'alanine.

Dans les protéines, on ne trouve, en dehors de la proline,que l'acide glutamique et l'hydroxyproline.

En examinant le tableau n° I7, on voit que la répartition de la radioactivité dans la proline libre et protéique est identique à celle que l'on observe dans les fractions globales.

La teneur ainsi que la radioactivité de cet acide aminé libre, faible durant le stade végétatif, devient de plus en plus forte à partir du 63ème jour, pour atteindre un maximum vers le 72ème jour. A l'inverse, la proline protéique est de moins en moins radioactive, mais ici, sa teneur varie relativement peu.

La proline ^{14}C est donc de moins en moins utilisée pour la synthèse protéique à partir de l'induction florale.

Cependant, il est important de souligner que les changements de teneur en proline libre sont antérieurs aux variations de radioactivité de cet acide aminé,aussi bien libre que protéique. Entre le 60ème et le 63ème jour (figure n° 21) sa teneur passe de 0,I0 à 0,4I micromole par gramme de poids frais alors que la radioactivité ne change pratiquement pas durant cette même période (97 810 à 86 820 cpm. Le déclenchement de changements importants dans

	Acides Aminés Protéiques			Acides Aminés libres			
	Ac. glutamique	Proline	OH-Proline	Ac. aspartique	Ac. glutamique	Proline	Amides
20°C							
58 j.	15 160 (16,2)	599 772 (10,5)	61 440 (0,46)	4 165 (1,10)	29 910 (2,43)	91 160 (0,11)	1 500
60 j.	14 860 (16,2)	581 840 (10,5)	62 640 (0,44)	4 240 (1,06)	31 560 (1,64)	97 810 (0,10)	1 700
63 j.	11 050 (16,3)	565 380 (9,2)	58 903 (0,60)	3 885 (0,69)	44 380 (2,65)	88 820 (0,40)	traces
65 j.	9 500 (15,7)	464 320 (10,7)	31 760 (0,54)	7 970 (1,20)	27 800 (2,61)	229 405 (0,68)	6 320
67 j.	11 200 (16,2)	241 600 (10,6)	17 280 (0,66)	15 955 (1,62)	72 295 (4,15)	396 775 (1,75)	9 505
69 j.	6 200 (17,3)	195 420 (11,1)	15 120 (0,54)	7 845 (1,08)	38 550 (3,84)	337 065 (1,84)	5 970
72 j.	14 580 (16,3)	48 260 (12,2)	3 720 (0,70)	8 165 (1,65)	33 505 (4,82)	545 870 (6,31)	6 020
74 j.	3 760 (17,1)	34 600 (11,6)	2 960 (0,67)	6 025 (1,95)	19 670 (4,50)	575 415 (9,75)	3 775
79 j.	12 220 (16,4)	75 340 (11,5)	5 960 (0,65)	11 230 (1,61)	42 390 (3,82)	724 265 (9,94)	5 880
85 j.	15 780 (16,8)	93 400 (11,61)	3 803 (0,62)	10 445 (1,28)	45 280 (3,28)	437 805 (6,24)	2 635
32°C							
60 j.	29 540 (16,1)	495 960 (11,9)	24 461 (0,62)	1 510 (0,76)	17 425 (2,0)	16 010 (0,06)	Traces
65 j.	31 120 (16,4)	501 880 (12,11)	34 300 (0,54)	Traces (0,81)	12 270 (2,21)	12 840 Traces	"
69 j.	37 780 (16,2)	533 860 (12,5)	34 320 (0,71)	1 465 (0,71)	12 970 (2,50)	16 560 Traces	"
79 j.	92 340 (15,9)	388 560 (12,2)	19 920 (0,56)	1 435 (0,77)	13 960 (2,46)	15 605 (0,08)	"

TABLEAU N° I7 : Répartition de la radioactivité, en coups par minute par gramme de poids frais, dans divers acides aminés libres et protéiques, de la tige et des jeunes feuilles de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c., à 20°C et 32°C, suivant l'âge de la plante.
(....) nombre de micromoles de chaque acide aminé par gramme de poids frais.

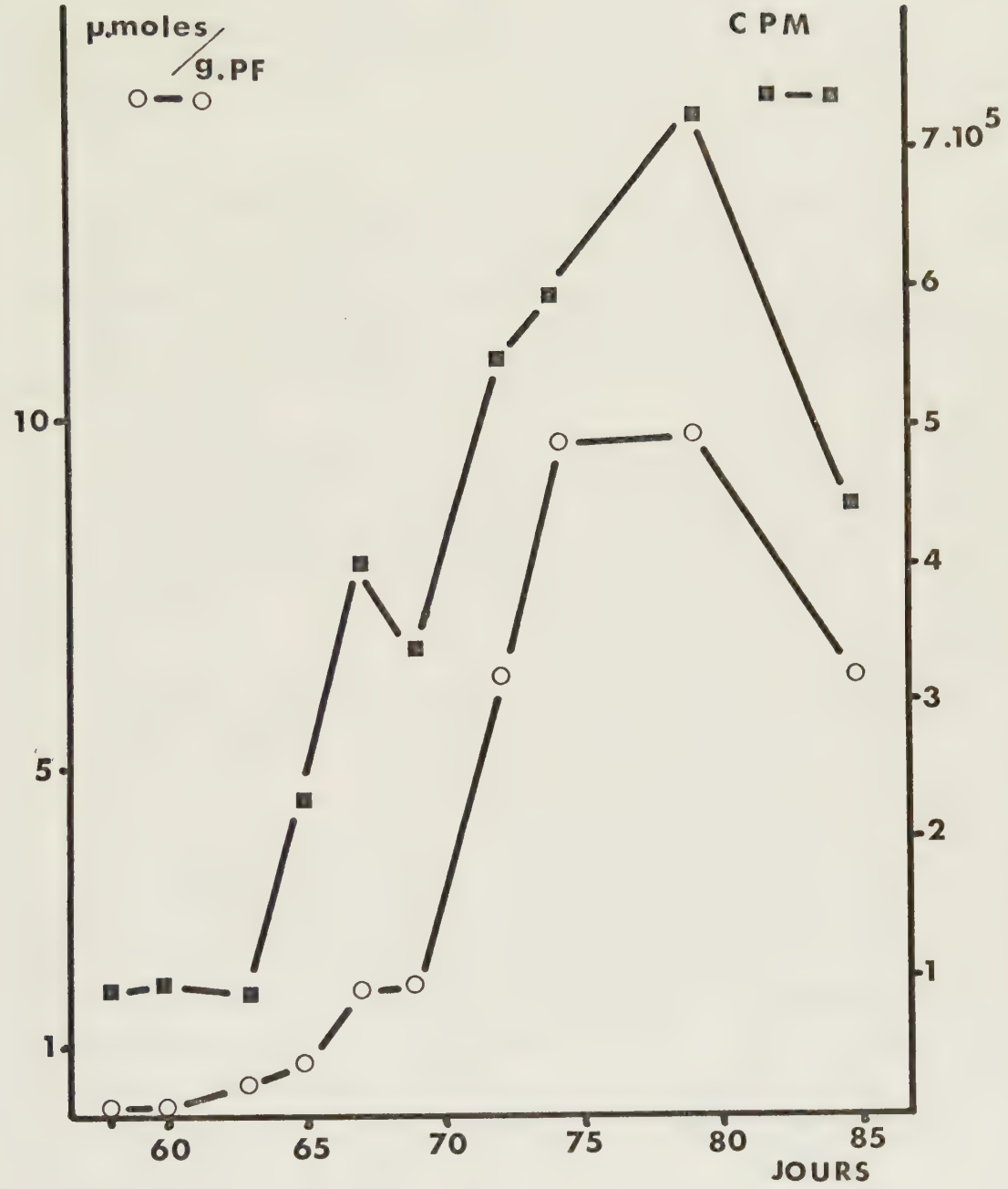


Fig. 2I : Radioactivité (en coups par minute) et teneur (en micromoles) de la proline libre du sommet de Nicotiana tabacum var. Xanthi n.c. suivant l'âge de la plante à 20°C.

le métabolisme de la proline parait donc avoir lieu entre le 60ème et le 63ème jour, avant toute manifestation d'une différence d'incorporation dans les protéines. Les différences ultérieures d'incorporation de la radioactivité dans les protéines ne seraient peut-être dues qu'à une dilution de la proline ^{14}C par la proline endogène qui s'accumule.

Si on exprime les résultats en radioactivité spécifique (figure n° 22), on fait ressortir d'une manière plus évidente encore, l'importance des changements métaboliques de la proline libre, à 20°C, entre le 60ème et le 63ème jour; quant à la proline protéique, son activité ne varie que postérieurement.

Les autres acides aminés radioactifs ne présentent pas de grosses variations ; ils sont tous un peu plus radioactifs vers le 67ème jour comme si, pendant un temps limité, il y avait activation du métabolisme.

Dans les plantes séjournant en permanence à 32°C, les divers acides aminés libres et protéiques n'évoluent guère avec l'âge de la plante.

En conclusion, il apparait que le métabolisme de la proline est très différent suivant le stade de développement de la plante. Les résultats observés sur les plantes élevées à 32°C indiquent bien que ces variations sont corrélatives d'un changement de stade physiologique. En réalité, le métabolisme de la proline dans les tissus en croissance existe sous deux formes : il existe un équilibre qui correspond au stade végétatif où la proline, dès sa synthèse est rapidement intégrée dans les protéines. Le deuxième équilibre, durant la phase de croissance des organes floraux, correspond à une synthèse accrue de proline avec accumulation dans les tissus jeunes.

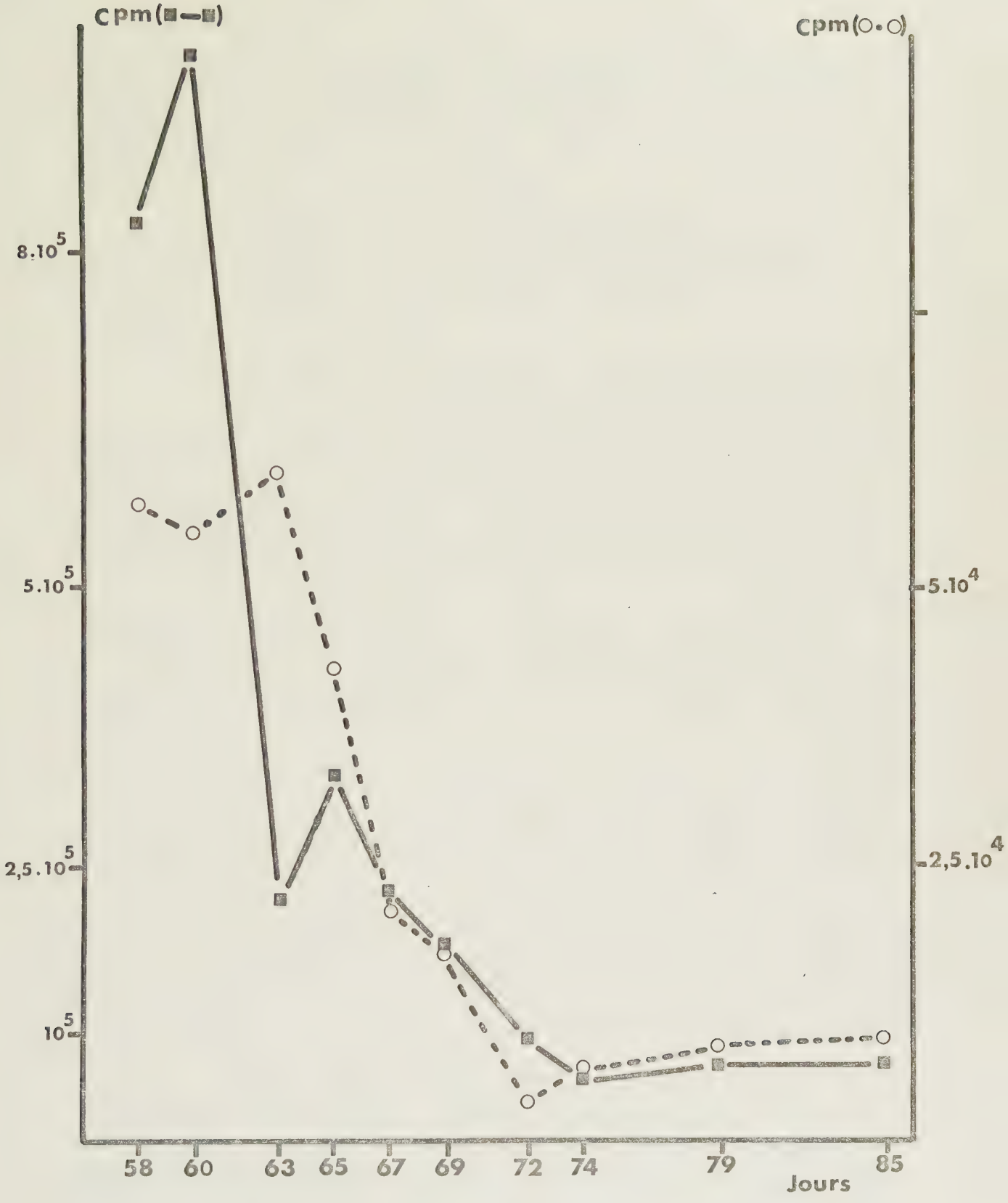


Fig. 22 : Après fourniture de proline ^{14}C, activité spécifique de la proline libre (■—■) et de la proline protéique (○---○) extraites de la tige et des feuilles du sommet de Nicotiana tabacum var. Xanthi n.c. en fonction de son âge.

Entre ces deux états, on a une période de transition qui est le témoin des nombreux changements accompagnant l'induction florale, c'est-à-dire la transformation d'un méristème végétatif en un méristème reproducteur.

Le passage à 32°C inhibe le déclenchement ou l'établissement de ce deuxième équilibre en même temps qu'il empêche la transformation du méristème terminal.

A la suite de ces expériences, deux questions se posent :

- les résultats obtenus avec la proline ^{14}C sont-ils spécifiques de cet acide aminé ? Nous avons tenté de répondre à cette question en utilisant d'autres éléments radioactifs, l'acide glutamique et l'arginine, acides aminés voisins de la proline d'une part et, la leucine considérée comme un bon marqueur des protéines.

- enfin, étant donné les différences d'intégration dans les protéines, n'y-a-t'il pas, suivant le stade de développement de la plante, des différences quantitatives ou qualitatives de synthèse protéique ?

Dans ce but, nous avons étudié la répartition de la radioactivité, après fourniture de proline ^{14}C, dans diverses protéines solubles séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide.

B - UTILISATION D'AUTRES ACIDES AMINES RADIOACTIFS (VALLEE, PERDRIZET, VANSUYT 1972 a)

Tous les essais effectués avec l'arginine ou la leucine ^{14}C l'ont été dans les mêmes conditions que pour la proline ^{14}C. Avec l'acide glutamique, élément central du pool des acides aminés dont le métabolisme est plus rapide que celui de la proline, par exemple, tou-

tes les conditions expérimentales ont été les mêmes, sauf le temps de métabolisme qui a été réduit d'une heure.

a) Absorption d'acide glutamique ^{14}C (U)

On fait absorber à des sommets de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n. c. végétatifs ou floraux à 20°C ou après 72 heures de transfert à 32°C, 25 μCi d'acide glutamique ^{14}C, uniformément marqué. On laisse ici, métaboliser durant 5 heures en fournissant de l'eau dès que la solution radioactive est absorbée.

Comparativement aux résultats précédents, il n'y a pas de différences significatives dans le nombre de coups par minute trouvé dans chaque fraction extraite de tissu végétatif ou floral, soit à 20°C, soit après transfert à 32°C (tableau n°18). Seule, la fraction contenant les sucres et les acides organiques est un peu plus radioactive dans les tissus floraux, 45 à 47 % du nombre de coups totaux, au lieu de 36 %.

L'absence de variations, en particulier au niveau des acides aminés libres et protéiques, est un résultat important par rapport aux expériences avec la proline ^{14}C. Elle met en évidence le caractère spécifique des différences antérieurement observées avec cet acide aminé.

L'étude de la répartition de la radioactivité dans les divers acides aminés libres ou protéiques (tableau n°19) ne révèle pas non plus de différences pour l'acide glutamique. Mais il apparaît un certain nombre de résultats intéressants, relatifs au métabolisme de la proline :

- durant la phase végétative, le nombre de coups par minute dans la proline libre est faible, ils représentent 0,94 % de la radioactivité totale comptée. Par contre, la proline protéique est fortement radioactive (9,3 %).

	VEGETATIF		FLORAL 20°C		FLORAL 32°C (72 h.)	
	cpm totaux	%	cpm totaux	%	cpm totaux	%
Sucres et A.O.	383 750	36,88	568 000	47,87	478 000	45,04
A.A. libres	339 513	32,62	342 140	28,83	316 000	29,84
Protéines	317 380	30,49	276 390	23,29	266 490	25,11
TOTAL	1 040 643	-	1 186 530	-	1 061 160	-

TABLEAU N° I8 : Répartition de la radioactivité dans diverses fractions extraites de sommets de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. végétatif ou floral à 20°C ou après 72 heures à 32°C, après absorption d'acide glutamique ^{14}C (U).

	VEGETATIF		FLORAL 20°C		FLORAL 32°C (72 h.)	
	coups par minute	%	coups par minute	%	coups par minute	%
A.A. libres						
ASP	12 187	0,95	19 460	1,69	23 130	2,20
ASP NH_2			1 350	0,12	16 550	1,60
GLU.	224 738	21,56	196 400	17,04	211 330	19,86
GLU NH_2	45 812	4,38	29 480	2,54	32 530	3,67
PRO.	9 900	0,94	40 140	3,49	4 000	0,37
Y NH_2 BUT	24 775	2,37	43 900	3,82	13 070	1,24
ALA.	Traces		4 200	0,38	3 000	0,35
SER.	-		3 850	0,35	1 660	0,16
Protéines						
ASP.	2 312	0,22	21 400	1,8	21 660	2,04
GLU.	210 375	21,06	195 260	16,95	188 900	17,69
PRO.	96 825	9,28	20 200	1,75	13 800	1,30
ALA.			1 350	0,1	Traces	

TABLEAU N° I9 : Répartition, en coups par minute et en pourcentage, de la radioactivité totale comptée dans les acides aminés libres et protéiques de la tige et des feuilles du sommet de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c., végétatif ou floral, à 20°C et après transfert à 32°C, suivant l'absorption d'acide glutamique ^{14}C (U).

- durant la phase florale à 20°C, on trouve 3,5 % de la radioactivité sous forme de proline libre (dans d'autres essais on a obtenu jusqu'à 7 %), mais on n'en trouve que 1,75 % dans la proline protéique.

Ces résultats confirment les expériences avec la proline ^{14}C : dans les plantes végétatives, il y a synthèse de proline suivie d'une incorporation rapide dans les protéines. Après l'induction florale, une fraction importante de la proline libre s'accumule dans les tissus jeunes de la plante au fur et à mesure de sa synthèse.

Après transfert des plantes florales à 32°C, la proline libre, comme la proline protéique est peu radioactive (0,37 % et 1,3 %). Tout se passe comme si la synthèse de cet acide aminé et non son intégration dans les protéines était ralentie, ou autre hypothèse, comme si sa dégradation était activée. Nous avons vu, en effet, qu'après fourniture de proline ^{14}C, la radioactivité de la proline protéique est très importante.

Nous avons porté sous forme d'histogramme (figure n°23) les divers résultats concernant la proline.

Quant aux autres acides aminés, il ne ressort pas de différences significatives interprétables des différents essais que nous avons effectués. Seules les amides, après transfert à 32°C, sont plus radioactives que dans les tissus restés à 20°C. Cette observation serait en faveur d'une dégradation plus importante, à 32°C, de la proline vers les amides via l'acide glutamique. En réalité quand on fournit la proline ^{14}C, les amides ne sont pas plus radioactives après transfert à 32°C. Il y aurait simplement activation du métabolisme de l'acide glutamique vers les amides, acide glutamique lui-même synthétisé à partir des sucres.

Les variations du métabolisme de la proline en fonction du

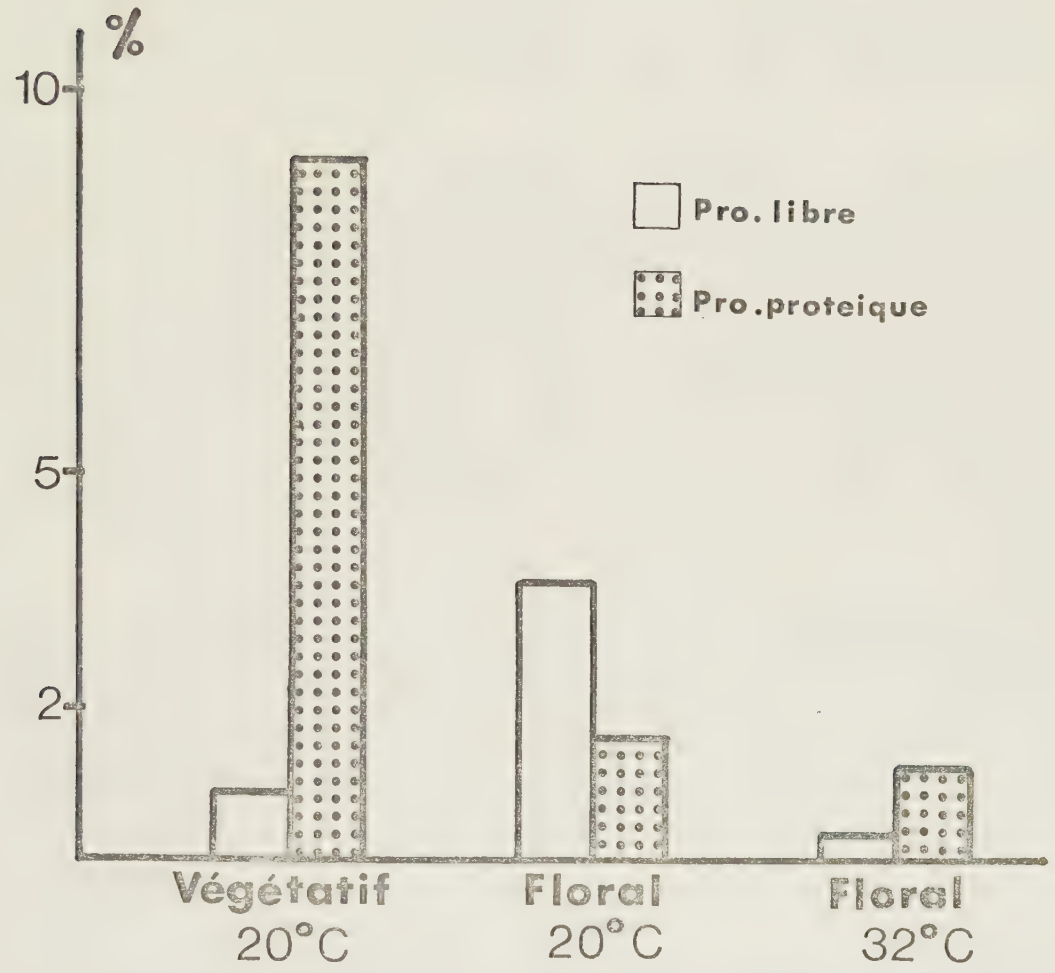


Fig. 23 : Pourcentage de radioactivité dans la proline libre et protéique de la tige et des feuilles de Nicotiana tabacum var. Xanthi n.c. suivant le stade de développement et la température, après absorption d'acide glutamique ^{14}C (U).

stade de développement et de la température sont donc spécifiques de cet acide aminé. Aucune autre variation semblable n'a été trouvée avec l'acide glutamique.

Cependant, nous avons cherché à confirmer ces résultats en utilisant deux autres acides aminés radioactifs : d'abord l'arginine, sachant que la proline peut être également synthétisée à partir de cet acide aminé, comme DURANTON (1959) l'a montré sur tubercule de topinambour in vitro, puis la leucine, acide aminé beaucoup plus éloigné de la proline que l'on considère comme un bon marqueur des protéines.

b) Absorption d'arginine ^{14}C ou de leucine ^{14}C

Les conditions expérimentales utilisées pour ces deux expériences sont les mêmes que pour la proline. On fournit à des sommets de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n. c. végétatifs et floraux à 20°C, ainsi qu'après 72 heures à 32°C, 25 μCi d'arginine ^{14}C (U) ou de leucine ^{14}C (U). On laisse métaboliser 6 heures en fournissant de l'eau dès que la solution est absorbée.

- Avec l'arginine, la comparaison du nombre de coups totaux trouvés dans chaque fraction ne montre pas de différences significatives suivant le stade de la plante (tableau n°20). Par contre, à l'inverse de l'acide glutamique, l'arginine est peu métabolisée, mais incorporée directement dans les protéines. Le tableau n°21 montre que 85 à 90 % de la radioactivité comptée est sous la forme d'arginine protéique.

Les acides aminés libres, dont l'arginine libre, sont très peu radioactifs. A côté de cela, on peut détecter des traces de radioactivité dans la proline libre des tissus floraux à 20°C, mais pas après transfert à 32°C.

	Végétatif 20°C		Floral 20°C		Floral 32°C (72 h)	
	cpm totaux	%	cpm totaux	%	cpm totaux	%
Sucres et A.O.	92 875	6,78	90 000	6,38	64 000	4,33
A.A. libres	7I 200	5,20	I02 870	7,29	79 980	5,4I
Protéines	I 204 700	88,0I	I 2I7 640	86,32	I 333 630	90,25
Total	I 368 775	-	I 4I0 5I0	-	I 477 6I0	-

TABLEAU N° 20 : Après absorption d'arginine ^{14}C (U), répartition de la radioactivité entre les diverses fractions extraites de la tige et des feuilles de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c., végétatif ou floral à 20°C et floral après transfert à 32°C (72 h).

	Végétatif 20°C		Floral 20°C		Floral 32°C	
	cpm totaux	%	cpm totaux	%	cpm totaux	%
Arg. libre	56 740	4,I4	7I 880	5,09	53 730	3,66
Arg. protéique	I I94 I25	87,24	I 2I2 250	85,93	I 322 450	89,50

TABLEAU N° 21 : Après absorption d'arginine ^{I4}C (U), radioactivité de l'arginine libre et de l'arginine protéique extraite de la tige et des feuilles de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. végétatif et floral à 20°C et floral après transfert de 72 h à 32°C.

Cette deuxième série d'expériences, confirme le caractère spécifique des variations mises en évidence pour la proline suivant le stade de développement et suivant que les tabacs sont ou non placés en conditions favorables au bon déroulement des processus physiologiques qui conduisent à la floraison.

Nous allons voir également qu'en utilisant la leucine ^{14}C (U) on arrive à des conclusions semblables.

- Avec la leucine ^{14}C, après chromatographie et autoradiographie, seule la leucine est radioactive ; quelques traces de radioactivité sont parfois observées dans d'autres acides aminés, mais il n'a pas été possible d'effectuer des comptages significatifs.

Après 6 heures de métabolisme, 97 % de la radioactivité totale comptée est intégrée dans les protéines (tableau n°22).

Dans les conditions utilisées, il n'y a pas de différences significatives d'incorporation de la leucine dans les protéines entre tissus végétatifs ou rendus tels par passages à 32°C, et tissus floraux.

	Végétatif 20°C		Floral 20°C		Floral 32°C	
	cpm totaux	%	cpm totaux	%	cpm totaux	%
Leucine libre	28 200	2,05	43 205	2,42	28 360	1,48
Leucine protéique	1 341 580	97,90	1 736 070	97,53	1 875 505	98,50

TABLEAU N°22 : Après absorption de leucine ^{14}C, répartition de la radioactivité dans la leucine libre et protéique de tissus de plantes végétatives et florales à 20°C ou de plantes florales transférées 72 h. à 32°C.

Nous venons donc de voir que l'utilisation de divers acides aminés ^{14}C ne permet pas de mettre en évidence des variations semblables à celles observées pour la proline dans les conditions précisées. Par contre, elle permet de confirmer le métabolisme particulier et spécifique de la proline au moment de l'induction florale.

Or, nous nous sommes aperçus au cours de ces expériences à l'aide d'éléments radioactifs que l'absorption des solutions fournies aux "sommets" de tabac était parfois très différente.

Ces observations nous ont incité à étudier la vitesse d'absorption de l'eau suivant l'âge de la plante et parallèlement nous avons déterminé les variations de poids sec et de transpiration.

Les techniques utilisées pour ce travail sont certes rudimentaires, mais elles ont été employées dans des conditions rigoureuses et les essais ont été répétés un grand nombre de fois.

C - MESURE DE L'ABSORPTION DE L'EAU PAR LE "SOMMET" DE *NICOTIANA TABACUM* var. Xanthi n. c.

Ces essais sont faits sur des tabacs élevés depuis le semis en salles climatisées à 20°C. Les mesures sont commencées au 50ème jour et poursuivies jusqu'à l'apparition des boutons floraux (85, 88ème jour). Du fait des variations de poids frais d'un échantillon à un autre, nous avons exprimé les résultats en microlitres d'eau absorbés par heure par gramme de poids frais et pour la transpiration en microlitres émis par gramme de poids frais.

La figure n°24 fait apparaître un certain nombre de résultats intéressants : l'absorption de l'eau est très ralentie dans les "sommets" de tabac à partir du 60, 62ème jour, puis à un moment précis (65ème jour), elle réaugmente à nouveau pour rediminuer. Enfin, pro-

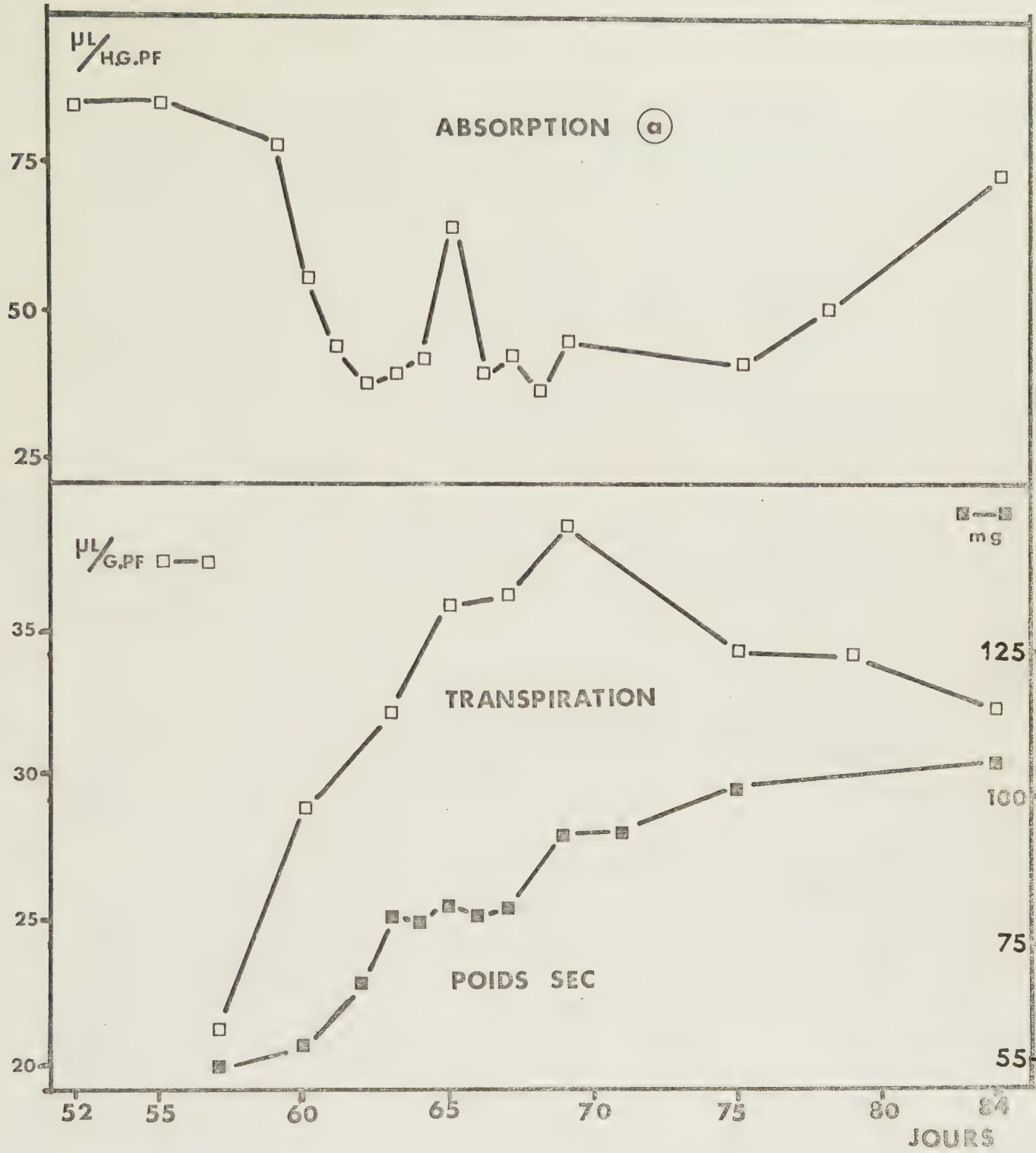


Fig. 24 : Vitesse d'absorption de l'eau (a), transpiration (□—□) et poids sec (■—■) des feuilles du "sommet" de Nicotiana tabacum var. Xanthi n.c. en fonction du développement.

gressivement, jusqu'à l'apparition des fleurs,elle augmente pour retrouver un niveau comparable à celui de jeunes tabacs. Parallèlement la transpiration ainsi que le poids sec des tissus augmentent.

On peut déduire de ces résultats qu'il se produit, au cours de la vie de la plante, un changement de besoin en eau des tissus, changement qui, dans la période comprise entre le 60ème jour et le 70ème jour, amène un déficit en eau dans les cellules.

Par la suite, les cellules retrouvent un nouvel équilibre de leur contenu en eau.

Corrélativement aux variations de la proline libre, il se produit donc aussi, à un stade précis, un changement d'équilibre hydrique des tissus.

A 32°C, comme pour la proline, il n'y a pas de variations détectables dans le contenu en eau ; la transpiration, comme l'absorption de l'eau est plus importante qu'à 20°C et relativement constante

Une étude approfondie de ce phénomène serait à entreprendre. Nous discuterons, dans la conclusion, ces résultats en les comparant à nos connaissances sur l'influence d'un "stress" en eau sur les tissus de divers végétaux.

D - TRAVAUX SUR LES PROTEINES

Les divers essais effectués sur les protéines des feuilles et de la tige de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n. c., ont été faits au moment où nous pensions que la moindre incorporation de la proline dans les protéines était la cause principale de son accumulation sous forme libre.

Bien que cette hypothèse, au moins dans sa première formulation, ne puisse plus être retenue, les résultats obtenus présentent un intérêt certain.

Après une série de dosages d'acides aminés protéiques et de protéines dites "solubles", nous avons tenté d'établir, s'il n'y avait pas de protéines particulières qui diffèrent dans cette fraction soluble globale, entre plantes végétatives et plantes en voie de reproduction.

a) Composition en acides aminés des protéines de feuilles issues de plantes végétatives ou florales.

Les tissus floraux à 20°C, mais surtout après transfert à 32°C, semblent un peu plus riches en protéines. Mais, par des dosages globaux, on ne peut pas affirmer que tel tissu est plus ou moins riche en protéines que tel autre tissu.

Il y a très peu de différence dans la composition en acides aminés des protéines de tige et de feuilles suivant le stade de développement et la température (tableau n°23).

La composition en acides aminés des feuilles est identique à celle qui a été établie par KAWASHIMA et TAMAKI (1967). Ces auteurs ont également noté qu'il y a peu de changements suivant le stade bien qu'il y ait des variations des acides aminés libres.

Dans les mêmes conditions, nous avons dosé les protéines solubles par la méthode de LOWRY.

b) Dosage des protéines solubles de feuilles de tabacs végétatifs ou floraux. Influence d'un transfert à 32°C.

Les dosages de protéines solubles ne font que confirmer les résultats des analyses de la composition en acides aminés des pro-

	20°C VEGETATIF		32°C		20°C FLORAL		32°C	
	µ moles	%	µ moles	%	µ moles	%	µ moles	%
OH.PRO.	0,38	0,18	0,48	0,20	0,84	0,36	1,45	0,48
ASP.	21,78	9,94	23,34	9,88	23,28	10,03	32,40	10,64
ASP.NH_2	-	-	-	-	-	-	-	-
THR.	10,88	4,97	11,18	4,73	11,34	4,88	14,90	4,89
SER.	10,78	4,92	11,22	4,75	11,27	4,85	15,82	5,19
GLU.	23,96	10,94	25,54	10,81	25,20	10,85	33,66	11,06
GLU.NH_2	-	-	-	-	-	-	-	-
PRO.	10,26	4,7	12,40	5,25	11,70	5,04	17,24	5,66
CIT.	-	-	-	-	-	-	-	-
GLY.	22,82	10,42	25,04	10,60	24,46	10,53	29,56	9,71
ALA	19,44	8,87	21,34	9,03	20,90	9,00	26,96	8,85
VAL.	16,06	7,33	17,50	7,41	17,72	7,63	23,02	7,56
CYS.	0,74	0,34	0,58	0,24	0,29	0,12	0,45	0,15
MET.	3,39	1,55	3,48	1,47	3,74	1,61	4,30	1,41
ILEU.	11,87	5,42	12,76	5,40	13,10	5,64	17,18	5,64
LEU.	19,26	8,79	21,74	9,20	20,96	9,02	24,48	8,04
TYR.	5,86	2,67	6,56	2,77	6,13	2,65	8,10	2,66
PHE.	9,46	4,32	10,06	4,26	9,82	4,23	13,40	4,40
ɣ NH_2 BUT.	-	-	-	-	-	-	-	-
ORN.	-	-	-	-	-	-	-	-
LYS.	16,52	7,54	17,28	7,31	15,75	6,78	20,72	6,80
TRY.	-	-	-	-	-	-	-	-
HIS.	4,01	1,83	4,42	1,87	4,11	1,77	5,52	1,81
ARG.	11,60	5,29	11,24	4,76	11,52	4,96	15,16	4,98

TABLEAU N° 23 : Composition en acides aminés des protéines de feuilles de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c., en micromoles par gramme de poids frais.

téines : il y a une légère augmentation du contenu en protéines solubles dans les plantes florales et surtout dans les plantes florales transférées 72 heures à 32°C (figure n°25).

Ces résultats ainsi que les différences d'incorporation de la proline ^{14}C dans les protéines nous ont incité à étudier la répartition de cet élément radioactif dans les diverses protéines solubles après séparation électrophorétique sur gel de polyacrylamide.

c) Répartition de la radioactivité dans les protéines solubles extraites de feuilles de tabacs végétatifs et floraux après absorption de proline ^{14}C.

L'absorption de la proline ^{14}C (U) est faite de la même manière que pour les expériences citées au début du chapitre, sur des "sommets" de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n. c. végétatifs et floraux à 20°C. Les extractions sont faites selon la technique de MAY, GILLILAND et SYMONS (1970) avec un tampon Tris à pH 8,5 (voir Techniques).

Mises à part quelques variations quantitatives, les diagrammes électrophorétiques (figure n°26 et 27) ne montrent pas d'autres différences entre feuilles de plantes végétatives et florales.

Du point de vue radioactivité, il n'y a pas non plus de changements qualitatifs. Toutes les bandes observées sur l'électrophorégramme sont moins radioactives dans les feuilles de tabacs en voie de reproduction. Aucune fraction particulière ne parait avoir incorporé plus ou moins de radioactivité que les autres.

Ce résultat renforce donc la deuxième hypothese que nous avons émise auparavant. Avec les techniques utilisées, nous n'avons pu mettre en évidence de changement dans les protéines des feuilles de tabac suivant le stade de développement.

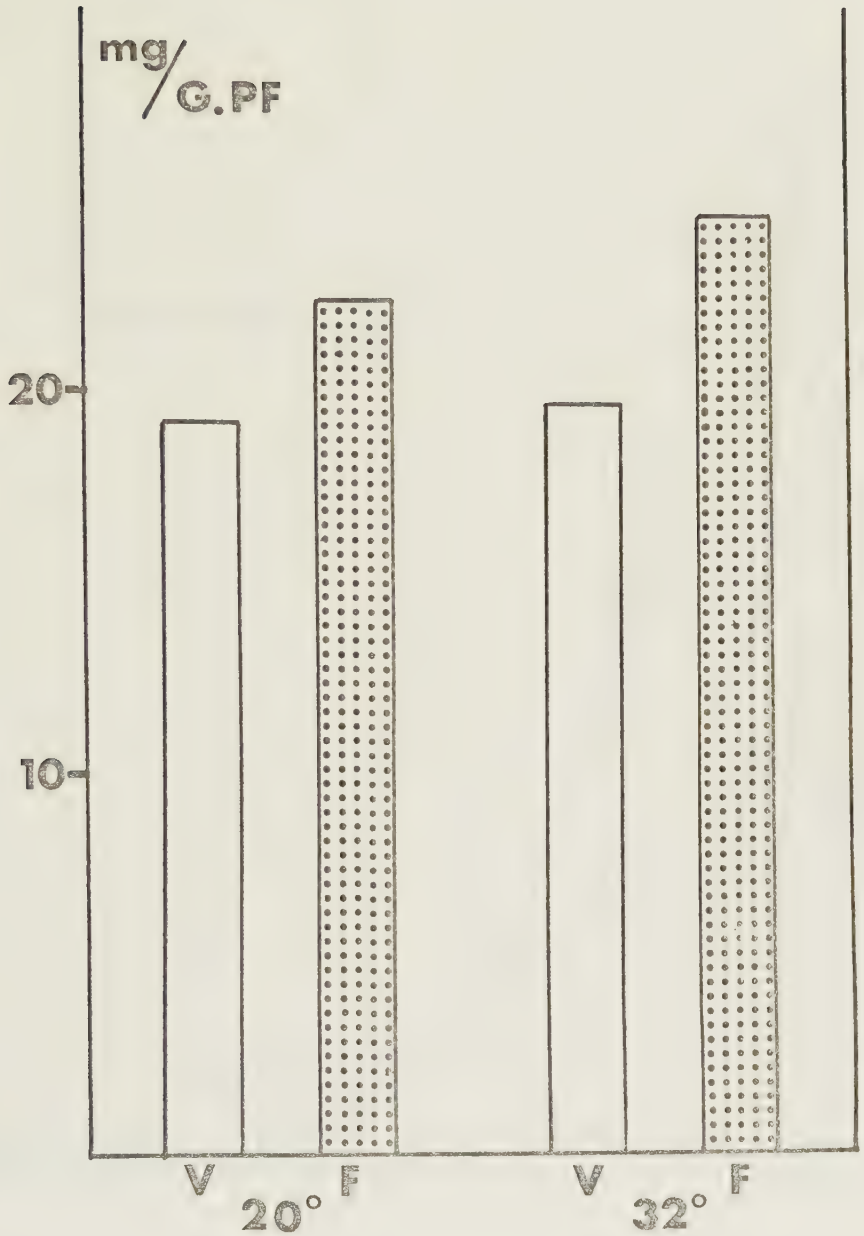


Fig. 25 : Dosage des protéines solubles extraites de "sommet" de Nicotiana tabacum var. Xanthi n.c.
végétatif (V) ou floral (F) à 20°C ou après transfert à 32°C (72 h).

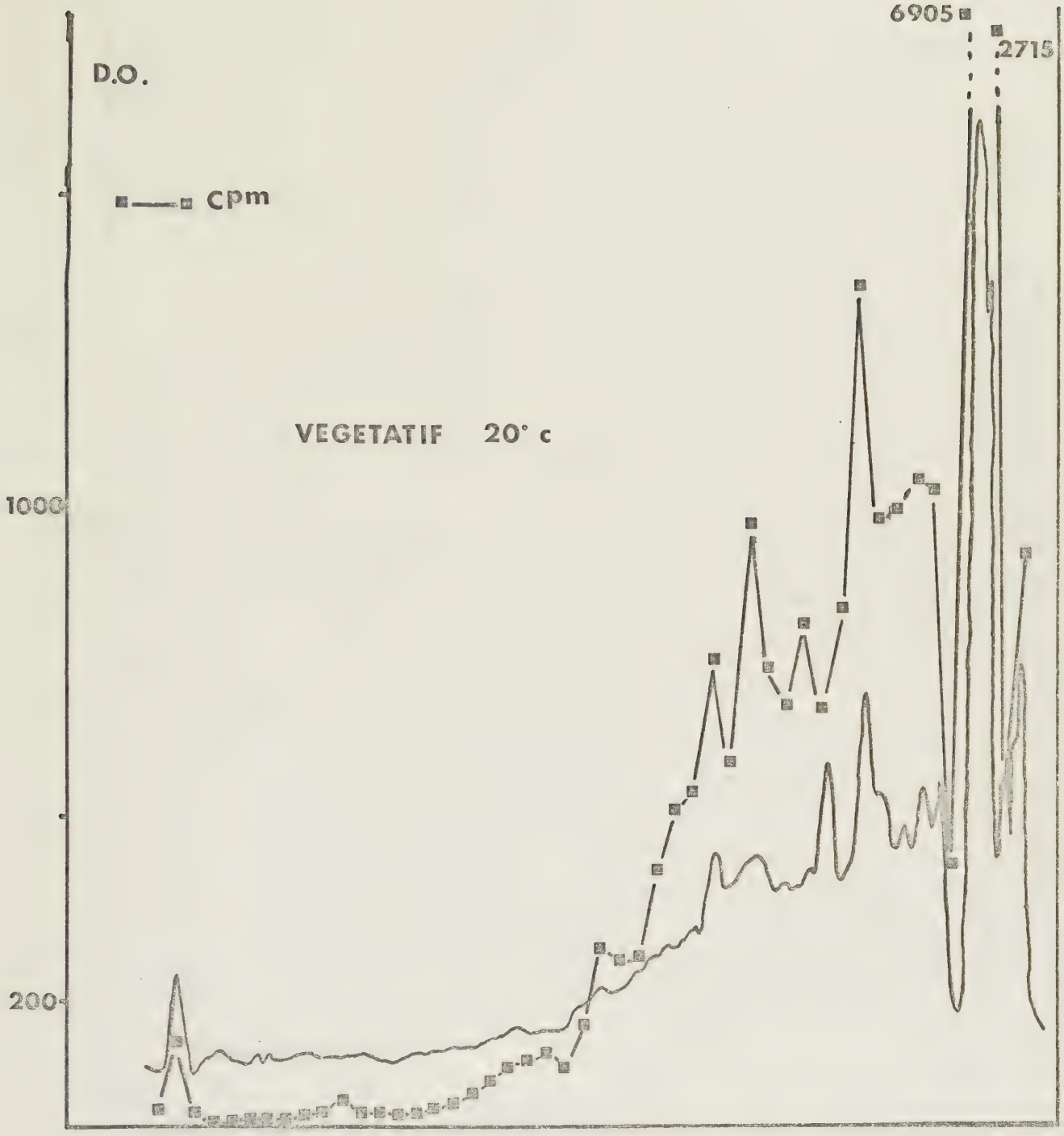


Fig. 26 : Diagramme électrophorétique et répartition de la radioactivité dans les protéines solubles de "sommet" de Nicotiana tabacum var. Xanthi n.c. végétatif à 20°C, après fourniture de proline ^{14}C (U).

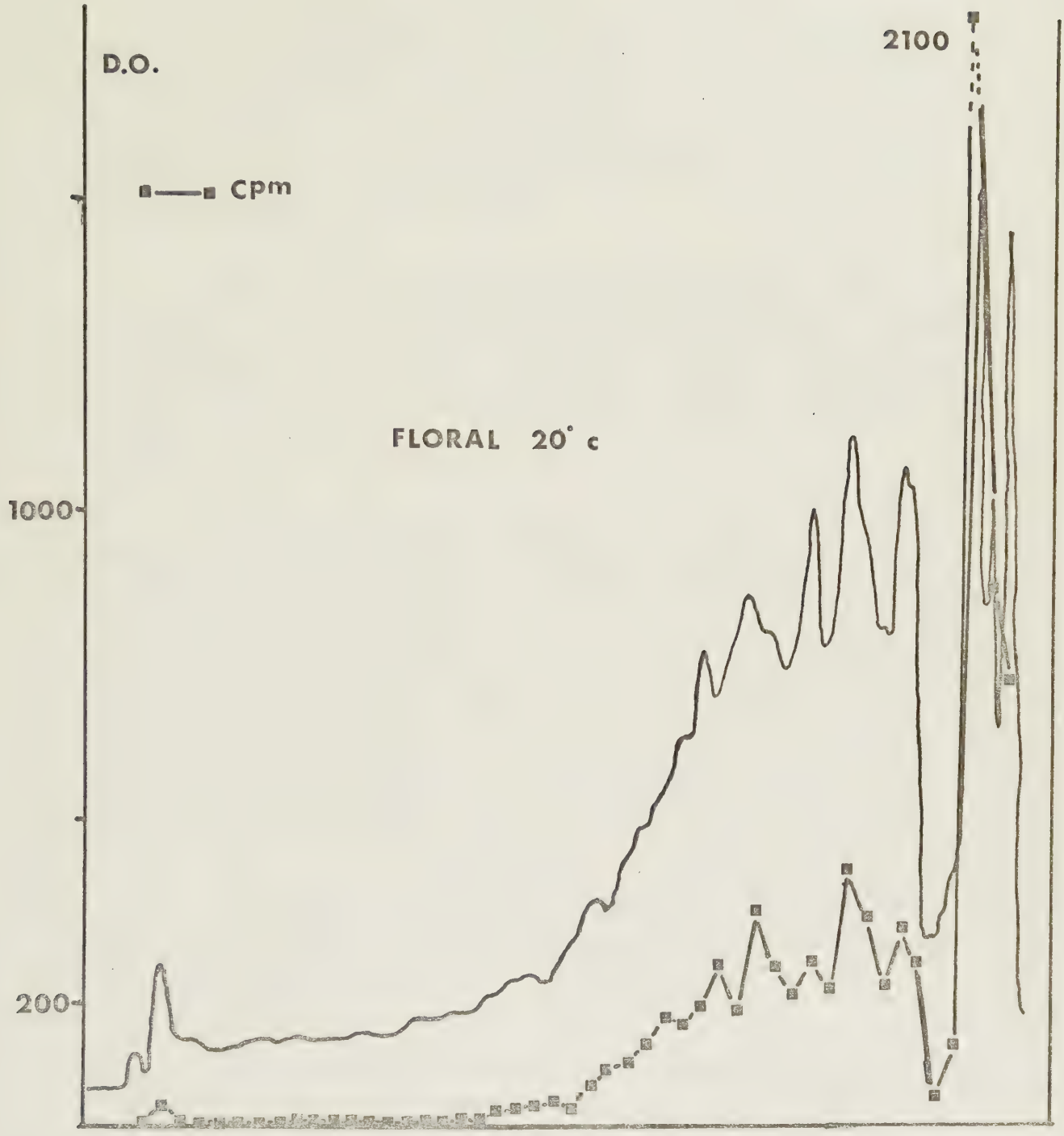


Fig. 27 : Diagramme électrophorétique et répartition de la radioactivité dans les protéines solubles extraites de "sommet" de Nicotiana tabacum var. Xanthi n.c., floral à 20°C, après fourniture de proline ^{14}C (U).

Les différences d'incorporation de la radioactivité dans les protéines paraissent refléter dans une très large mesure la dilution de la proline ^{14}C donnée par la proline libre endogène. Mais nous n'avons aucune preuve que ce soit la seule raison. Le phénomène primordial serait donc le déclenchement de l'accumulation de cet acide aminé sous forme libre.

En conclusion, il existe donc chez *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c. à un moment déterminé de son développement, un changement profond du métabolisme de la proline. Cet acide aminé s'accumule dans les tissus en croissance à partir d'un stade voisin de l'induction florale.

A l'aide de divers éléments radioactifs, nous avons pu mettre en évidence une différence spécifique d'incorporation de cet acide aminé dans les protéines,mais il est impossible encore de savoir si le seul mécanisme responsable de ces différences n'est pas la dilution de la proline radioactive par la proline endogène. Quoiqu'il en soit, la teneur en proline libre des tissus augmente avant que ne soient décelables des changements d'intégration dans les protéines. Il y a donc, à un stade précis de la vie de la plante, activation de la synthèse de cet acide aminé.

D'un autre côté, dans des conditions d'inhibition de la floraison, c'est-à-dire à 32°C, il n'y a aucun changement du métabolisme de cet acide aminé.

Il parait donc exister un métabolisme de "type végétatif" et un métabolisme de "type floral", le passage de l'un à l'autre se réalisant en une période relativement courte de la vie de la plante.

Avant l'apparition des boutons floraux, la proline libre est présente en quantité importante dans les jeunes feuilles et la

tige correspondante ; par la suite, lors de l'épanouissement des fleurs, elle se trouve, principalement dans les étamines. A ce moment, elle est, en quelque sorte, protégée d'un éventuel passage de la plante à une température qui provoque une diminution de sa teneur, soit par dégradation, soit par utilisation pour la synthèse protéique.

Certaines observations faites au cours des essais sur le métabolisme de la proline permettent de penser que le comportement des tissus vis-à-vis de l'eau est profondément modifié au cours du changement d'équilibre cellulaire qui correspond à l'induction florale.

∿∿∿

CONCLUSION GENERALE - DISCUSSION

Au cours de toutes les expériences résumées dans ce mémoire, nous sommes arrivés à la conclusion que la teneur en proline libre ainsi que son utilisation pour la synthèse protéique sont les témoins des nombreux processus qui entrent en jeu lors du passage à l'état reproducteur.

Cependant, nous n'avons jamais pu démontrer que cet acide aminé joue un rôle quelconque dans ces phénomènes.

De très nombreux travaux ont été effectués depuis plusieurs années sur cet acide aminé. On peut, en réalité, les répartir en deux groupes principaux suivant la manière dont le travail a été abordé :

- Mise en évidence et rôle de la proline et de l'hydroxyproline dans certaines macromolécules de la paroi cellulaire.

- Importance de la proline lors d'un "stress".

Mais ces deux types de recherche ne sont peut être pas aussi éloignés qu'il ne le parait.

a) La proline et l'hydroxyproline dans les protéines de la paroi.

C'est STEWARD et ses collaborateurs en 1950 qui les premiers mirent en évidence l'existence d'hydroxyproline dans les protéines cellulaires de végétaux.

En 1960, DOUGALL et SHIMBAYASHI ainsi que LAMPORT et NORTHCOTE (a et b), après détermination de la composition en acides aminés de protéines de paroi cellulaire, arrivent à la conclusion que

l'hydroxyproline est un constituant essentiel de ces protéines.

Depuis on a très largement étudié le mode d'incorporation de cet acide aminé dans les protéines. De grandes ressemblances avec le collagène ont fait proposer par LAMPORT en 1963, le terme d'"extensine" à ces protéines de la paroi.

La transformation de la proline en hydroxyproline se fait par fixation d'oxygène (LAMPORT, 1963) sur des molécules de proline déjà incorporées dans des protéines (POLLARD et STEWARD, 1959 - OLSON 1964 - LAMPORT 1965 - SADAVA et CHRISPEELS 1971).

Par contre, pour STEWARD et ses collaborateurs (1958 a) l'hydroxyproline fournie serait absorbée, mais pas intégrée dans les protéines. Plus récemment, HOLLEMAN (1967), CLELAND et OLSON (1968), en utilisant l'αα' dipyridyl qui inhibe l'hydroxylation de la proline, ont montré que l'hydroxyproline pouvait être incorporée directement dans les protéines. Dans cette optique on a effectué de nombreux essais avec cet acide aminé, sur coléoptyle d'avoine (CLELAND 1967 a et c), sur cellules de Sycomore (HOLLEMAN, 1967), sur coléoptyle de blé (PILET, 1968). En fournissant de la proline ou de l'hydroxyproline à des cultures de tissus de carotte, STEWARD et POLLARD (1958) ont constaté que ces deux composés agissent comme antagonistes l'un de l'autre. Séparément ils provoquent une inhibition importante de l'élongation cellulaire due à l'auxine (CLELAND, 1962). HUBAC en 1966, étudiant les substances inhibitrices de levée de dormance dans les caryopses immatures de blé Fylgia a retrouvé un résultat semblable. D'après CLELAND et KARLSNES (1967) les protéines riches en hydroxyproline jouent un rôle prépondérant dans les mécanismes d'arrêt d'élongation cellulaire.

Il y a donc au niveau du cytoplasme une synthèse de protéines dont certains résidus prolyl sont hydroxylés. Ces protéines secrétées vers la paroi cellulaire (CHRISPEELS, 1969, 1970 a et b)

sont liées à des polysaccharides (LAMPORT 1967 a et b) par une liaison hydroxyproline-arabinose).

Bien qu'ayant abondamment travaillé sur la proline et l'hydroxyproline, STEWARD et ses collaborateurs ont toujours nié l'existence des "protéines à hydroxyproline" de la paroi. POLLARD et STEWARD en 1959 concluaient que le matériel cellulaire contenant cet acide aminé est présent dans le cytoplasme ; les éléments radioactifs apportés, la proline ^{14}C en particulier, s'accumulent dans une fraction insoluble dans un tampon, mais distincte des protéines de la paroi. Ce résultat a même été confirmé par une étude autoradiographique (STEWARD et coll., 1970). Actuellement ces auteurs se demandent toujours quel peut être le rôle de ces protéines.

Il faut rappeler que, pour ce travail, STEWARD et coll. n'ont pas utilisé le même matériel, ni les mêmes techniques. Par contre, SADAVA et CHRISPEELS (1969), après fourniture de proline tritiée à des tissus de carottes, trouvent, après autoradiographie, la radioactivité surtout au niveau de la paroi. Il reste encore à trancher entre ces deux types de résultats.

Pendant longtemps, nous avons pensé que nos résultats pouvaient s'interpréter dans ce cadre, d'autant plus que STEINER et LANGE en 1968 avaient montré qu'il y avait interaction entre l'inhibition d'élongation par l'hydroxyproline et celle provoquée par le phytochrome sous l'influence de rouge lointain. Les modifications de teneur en proline libre ainsi que les changements d'intégration de cet acide aminé radioactif dans les protéines correspondraient à des variations dans la synthèse de ces protéines de la paroi. Les tissus de plantes florales synthétiseraient moins cette catégorie de protéines que les tissus de tabacs végétatifs. Cependant l'activation de la synthèse de la proline paraissant être le phénomène primordial, nous avons abandonné cette hypothèse d'une relation directe de la proline

libre et des protéines de la paroi. Mais il y a peut être une corrélation plus lointaine qui nous a été suggérée par les autres recherches faites sur cet acide aminé.

b) La proline libre au cours d'un "stress".

Certains mécanismes mis en jeu dans les phénomènes de résistance à des "stress" naturels ou artificiels, liés à l'équilibre hydrique des cellules, action du froid, de la sécheresse, d'un excès d'éléments minéraux, par exemple, paraissent semblables ; la proline libre, ici, tient une place prépondérante.

Dans le cas de plantes soumises au gel, LE SAINT (1966) chez le chou de Milan, a mis en évidence l'importance de cet acide aminé lors de l'acquisition de la résistance au froid : les plantes, à la lumière, au cours de l'endurcissement au gel, accumulent la proline. Si on fournit de la proline exogène avant la mise au froid, les plantes acquièrent une capacité plus grande de résistance aux basses températures (LE SAINT, 1969 a et b).

Il existe, d'autre part, une relation étroite entre la proline et les sucres simples. La lumière est nécessaire à la synthèse des glucides, ces derniers sont les précurseurs de la proline qui s'accumule au froid peut être à cause d'une diminution de la synthèse des protéines. Cette dernière hypothèse a été également avancée par STEWART, MORRIS et THOMPSON en 1966, dans le cas de feuilles détachées, donc soumises à une déshydratation.

Enfin, LE SAINT (1969 b et c) a montré que l'endurcissement était transmissible des feuilles plus agées vers les jeunes feuilles, parallèlement à un transfert de la proline, alors que les jeunes feuilles ne peuvent pas transmettre cet endurcissement et qu'il n'y a pas de transfert de proline.

Divers dosages d'acides aminés libres de blé au cours de la vernalisation ont donné des résultats semblables : il y a accumulation de proline (TRIONE, YOUNG et YAMAMOTO, 1966 et 1967 , SHVEDSKAYA et KRUZHILIN, 1966) au cours du passage au froid.

Des résultats semblables ont été obtenus avec des plantes ou des fragments de plantes soumises à un régime de sécheresse.

Les premiers, KEMBLE et MAX PHERSON (1954), puis BARNETT et NAYLOR ainsi que ROUTLEY en 1966, en soumettant des plantes à des régimes pauvres en eau, ont observé une accumulation très importante de proline durant la période de sécheresse. Selon ces auteurs, les sucres, le glucose en particulier, ont une importance primordiale.

HUBAC en 1966, après avoir vérifié que la proline est un inhibiteur d'élongation cellulaire, a montré en outre, que cet acide aminé est capable d'accroître la résistance à la dessication. L'adjonction de proline à des plantes leur confère une capacité plus grande de résistance.

Depuis ces résultats ont été vérifiés sur un nombre important de végétaux ; le contenu en proline est une bonne image des quantités d'eau mises à la disposition de la plante, (SAVITSKAYA 1967, PALFI, JUHASZ, 1968 et 1971, KUDREV 1970).

Mais on ne sait pas encore de façon absolue si l'accumulation de cet acide aminé est due à une forte synthèse ou à une protéolyse ; pour KUDREW, il s'agit de protéolyse, mais d'autres auteurs comme STEWART (1967) pensent qu'il s'agit d'une activation de synthèse de la proline.

Il existe d'autres exemples où l'on peut mettre en évidence une relation entre degré d'hydratation des tissus et proline. C'est le cas, en particulier, des plantes élevées sur un milieu riche en chlorure de sodium. Chez les plantes halophytes *Aster tripolium*, par exemple, (GOAS, 1965 et 1966), il y a accumulation de proline libre dans la plante poussant sur sol salé ; ces mêmes plantes, élevées sur milieu plus pauvre en sel, ne contiennent que de faibles quantités de cet acide aminé.

Après fourniture d'acide glutamique ^{14}C (GOAS et coll. 1970, LARHER et coll. 1970), la proline libre est radioactive dans les plantes sur milieu salin, alors qu'elle l'est peu sur milieu non salin.

Après fourniture de proline ^{14}C (GOAS, 1971 et LARHER, 1971) trouvent des résultats semblables aux nôtres : en milieu salin, donc quand les tissus sont riches en proline libre, la proline protéique est peu radioactive ; en milieu non salin, au contraire, la proline protéique est très radioactive, aux dépens de la proline libre.

En outre, dans un certain nombre de plantes atteintes de maladies virales, par exemple, enroulement de la pomme de terre, où il y a accumulation de proline libre et de glucides simples, PERDRIZET (1972) a émis l'hypothèse qu'il y avait corrélativement un déséquilibre du métabolisme de l'eau.

A côté de ces travaux, il faut aussi souligner les expériences relatives à la conservation de fruits charnus, pommes et poires. ULRICH (1958), puis PECH, FALLOT et CARLES (1970) ont observé une augmentation considérable de teneur en proline libre au cours de la conservation de fruits à 4°C ou à 15°C.

Parallèlement, ULRICH a montré que la teneur en acides aspartique et glutamique diminue progressivement. Selon PECH et coll., l'accumulation de cet acide aminé est liée à la disparition des acides aspartique et glutamique.

Enfin, après ensemencement d'une souche de *Saccharomyces cerevisiae* sur un milieu favorable à la sporulation, RAMIREZ et MILLER (1963) ont constaté une augmentation de proline libre dans le milieu dès l'apparition des premières spores.

Des changements métaboliques importants de la proline sont donc associés à des perturbations de l'équilibre hydrique des cellules. Les plantes soumises à un "stress" en eau accumulent des quantités énormes de proline ; elles ont également leur croissance ralentie. Nous avons pu mettre en évidence un phénomène semblable sur tabac en limitant l'apport d'eau ou en ajoutant à la solution nutritive diverses concentrations en chlorure de sodium. Dans ce cas, la croissance est aussi inhibée. Signalons, de plus, que ces tabacs fleurissent après avoir émis moins de feuilles que les témoins.

Comme l'ont proposé PROTSENKO, SMATKO et RUBANYUK en 1968 (PALFI, 1970), la proline pourrait provoquer une augmentation de l'hydratation du contenu cellulaire au moment du "stress". La croissance serait également inhibée (HUBAC, 1966) ce qui limiterait la plasmolyse des cellules. Les protéines particulières de la paroi, riches en proline et en hydroxyproline auraient ici un rôle à jouer. Un changement de perméabilité donnerait à la cellule une structure et un métabolisme différents.

Les sucres auraient à la fois comme rôle, d'être le précurseur de la proline, mais aussi le précurseur des polysaccharides associés aux protéines de la paroi (LAMPORT, 1965, 1967 a et b), enfin de donner à la cellule en même temps que la proline une pression osmotique suffisante.

Chez les *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n. c., nous avons vu qu'il existe, lors de l'induction florale, un comportement des tissus vis-à-vis de l'eau profondément modifié qui pourrait avoir les mêmes conséquences sur le métabolisme de la proline que celles observées au cours d'un choc en eau : le poids sec des feuilles du sommet augmente (page 112), la vitesse d'absorption des solutions aqueuses diminue, la répartition d'éléments radioactifs est modifiée, la transpiration de ces feuilles s'accroit.

Etant actuellement limité par la finesse des techniques, il est impossible de dire quel est de tous ces facteurs, accumulation de proline compris, le premier qui varie, mais il semble que ce soit la vitesse d'absorption de l'eau. Le changement d'équilibre hydrique de certaines cellules ou de certains tissus a peut être une importance fondamentale pour le déclenchement des processus de la mise à fleurs. N'oublions pas que chez *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n. c., dès l'induction florale la croissance est modifiée. Une très belle illustration est apportée par les travaux de BOUNIOLS et MARGARA (1971 a et b). Ces auteurs obtiennent, sous des conditions photopériodiques favorables, néoformation de bourgeons floraux à partir d'explants de racines de *Cichorium intybus* cultivées sur milieu gélosé. Par contre, sur milieu liquide, quelles que soient les conditions, ils n'obtiennent jamais de boutons floraux, mais uniquement des bourgeons végétatifs. En milieu gélosé, la proline libre des tissus s'accumule alors qu'en milieu liquide, celle-ci tend à disparaître. Or, en ajoutant de la proline au milieu liquide, ils obtiennent un nombre important de bourgeons floraux. Hormis la proline, deux acides aminés voisins permettent la néoformation de boutons floraux, mais en nombre nettement moindre : ce sont l'acide glutamique et l'arginine qui sont, rappelons le, des précurseurs de la proline.

La présence de proline en quantité importante, ou de l'un de ses précurseurs, apparaitrait comme une condition nécessaire pour la néoformation de boutons floraux.

La fourniture de proline a peut être permis un changement de l'hydratation des tissus ou un changement de perméabilité, plaçant ainsi les cellules dans des conditions favorables au déroulement de l'induction florale.

Le métabolisme de la proline et celui de l'eau paraissent donc étroitement liés au moment de l'induction florale, c'est-à-dire au moment où se produit la perception, la transmission et l'action d'un stimulus, qui va permettre la transformation d'un méristème végétatif en méristème reproducteur. Une modification du degré d'hydratation des cellules ou un changement de perméabilité, par exemple, provoque un changement de l'état cellulaire, se manifestant par un métabolisme différent de la proline existant aussi dans le cas d'un "stress" artificiel.

Ajoutons à ceci, les résultats obtenus dernièrement par MIZRAHI, BLUMENFELD, BITTNER et RICHMOND (1971). Après avoir soumis des racines de tabacs à différents degrés d'humidité ou à diverses concentrations en sel, ils ont montré qu'il y a dans les feuilles un changement de concentration de certaines hormones. Ces auteurs concluent : "Il est tentant de suggérer que les variations du contenu en eau des feuilles constitue un signal primaire pour une modification de la balance hormonale de la plante".

Un travail important reste à effectuer dans ce cadre ; nous nous proposons de le poursuivre dans deux directions :

- a) En cherchant à déterminer les mécanismes qui déclenchent l'accumulation de proline.

Des essais sur le métabolisme de l'eau sont à envisager ; en outre, si le changement d'équilibre hydrique des cellules provoque l'accumulation de la proline, il est probable que certaines activités enzymatiques liées à cet acide aminé sont en cause. Les premiers essais porteront sur la pyrroline 5carboxylate réductase, enzyme étudiée sur

le tabac par NOGUCHI, KOIWAI et TAMAKI en 1966 et sur la proline oxydase, selon la technique de MAZELIS et FOWDEN (1971).

- b) Arrivé à ce point de notre travail, il est nécessaire de revenir aux raisons premières qui nous ont amenés à l'entreprendre, à savoir l'étude des mécanismes de la résistance à la multiplication virale. Des expériences identiques, non plus sur plantes saines, mais sur des tabacs virosés doivent être entreprises.

L'explication des variations observées de la proline suivant l'âge ou le stade de la plante et les conditions ambiantes, permettra peut être de répondre à certaines questions qui touchent de près certains aspects fondamentaux de la biochimie de la différentiation. De plus, si c'est le cas, elle aidera à la compréhension des mécanismes de la réaction hypersensible, caractère génétique dont l'importance agronomique est indéniable.

∿∿∿∿

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. AGHION-PRAT D., 1965 - Néoformation de fleurs in vitro chez Nicotiana tabacum L. Physiol. Vég., 3, 229-305.

2. BARNETT N.M. and NAYLOR A.W., 1966 - Amino acid and protein metabolism in Bermuda grass during water stress. Plant Physiol., 41, 1222-1230.

3. BIDWELL R. G. S., STEWARD F.R.S. and BARR R.A., 1964 - Protein synthesis and turn-over in cultured plant tissues: sources of carbon for synthesis and the fate of the protein breackdown products. Nature, 203, 367-373.

4. BISERTE G. et BOULANGER P., 1950 - Dans "Technique de laboratoire" Loiseleur, 1963, 1, 499.

5. BOUNIOLS A. et MARGARA J., 1971 - Influence de la nature du milieu liquide ou gélosé sur la composition en acides aminés des tissus de racine d'Endive (Cichorium intybus L.) au cours de la néoformation in vitro de bourgeons végétatifs ou inflorescentiels. C.R. Acad. Sci., Paris, série D, 273, 1104-1107.

6. BOUNIOLS A. et MARGARA J., 1971 - Influence de l'adjonction d'acides aminés au milieu de culture sur l'induction florale des bourgeons de Cichorium intybus L. néoformés in vitro. C.R. Acad. Sci., Paris, série D, 273, 1193-1196.

7. BRITIKOV E.A., VLADIMIRTSEVA S.V. and MUSATOVA N.A., 1965 - Transformation of prolin in germinating pollen and pistil tissues. Fiziol. Rast., 12, 953-967.

8. BRITIKOV E.A., MUSATOVA N.A. et VLADIMIRTSEVA S.V., 1966 - Influence de la proline et de ses antimétabolites sur la germination du pollen et la croissance des tubes polliniques. Fiziol. Rast., 13, 978-987.

9. CHRISPEELS M.J., 1969 - Synthesis and secretion of hydroxyproline containing macromolécules in carrots. I - Kinetic analysis. Plant. Physiol., 44, 1187-1193.

10. CHRISPEELS M.J., 1970 - Synthesis and secretion of hydroxyproline containing macromolécules in carrots. II - In vivo conversion of peptidyl prolineto peptidyl hydroxyproline. Plant Physiol., 45, 223-227.

11. CLELAND R., 1962 - Hydroxyprolin as an inhibitor auxin induced cell elongation. Nature, 200, 908-909.

12. CLELAND R., 1967 (a) - Inhibition of cell elongation in Avena coleoptile by hydroxyproline. Plant Physiol., 42, 271-274.

13. CLELAND R. et KARLSNES A.M., 1967 (b) - A possible role of hydroxyproline containing proteins in the cessation of cell elongation. Plant Physiol., 42, 669-671.

14. CLELAND R., 1967 (c) - Inhibition of formation of protein bound hydroxyproline by free hydroxyproline in Avena coleoptiles. Plant Physiol., 42, 1165-1170.

15. CLELAND R. and OLSON A.C., 1968 - Direct incorporation of hydroxyproline into Avena coleoptiles protéins. Biochemistry, 7, 1745-1751.

16. DAVIS B.J., 1964 - Disc electrophoresis. II Method and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 404-427.

17. CONDAMINE H., 1971 - Sur la régulation de la production de proline chez Escherichia Coli K_{12}. Ann. Inst. Pasteur, 120, 126-143.

18. DAVID J., ARENS M.F. et COHET Y., 1971 - Stérilité mâle à haute température chez Drosophila melanogaster. C.R. Acad. Sci., série D, 272, 1007-1010.

19. DOERSCHUG M. R. and CHRISPEELS M.J., 1970 - Synthesis and secretion of hydroxyproline containing macromolécules in carrots : III Metabolic requirements for secretion. Plant Physiol., 46, 363-366.

20 - DOUGALL D.K. and SHIMBAYASHI K., 1960 - Factors affecting growth of tobacco callus tissue and its incorporation of tyrosine. Plant Physiol., 35, 396-404.

21. DOUGALL D.K., 1965 (a) - The biosynthesis of protein amino acids in plant tissue culture. I. Isotope competition experiments using glucose, U, ^{14}C and the protein amino acids. Plant Physiol., 40, 891-897.

22. DOUGALL D.K., 1965 (b) - The biosynthesis of protein amino acids in plant tissue culture. II - Further isotope competition experiments using protein amino acids. Plant Physiol., 41, 1411-1415.

23. DURANTON H., 1959 - Etude du métabolisme de l'arginine libre dans les tissus du topinambour cultivé in vitro. Thèse de Doct. Faculté des Sciences, Paris.

24. ERICKSON, 1967 - Dans "La stérilité mâle cytoplasmique chez les végétaux" - BERVILLE A. et DEMARLY Y. Eucarpia - Versailles 1970, 147-168.

25. FUJISHITA N., 1964 - Cytological, histological and physiological studies on pollen degeneration. I The relation between pollen degeneration in male sterile vegetables and free amino acids. J. Jap. Soc. Hort. Sci., 33, 133-139.

26. FUKASAWA H., 1954 - On the free amino acids of anthers of male sterile wheat and maize. Jap. J. Genet., 29, 135-137.

27. GIANINAZZI S., 1970 - Hypersensibilité au virus de la mosaïque du tabac chez divers Nicotiana ; effet thermique et protéines solubles. Thèse de Doct., Faculté des Sciences, Genève.

28. GOAS M., 1965 - Sur le métabolisme azoté des halophytes. Etude des acides aminés et des amides libres. Bull. Soc. Fr. Physiol. Vég., 11, 309-315.

29. GOAS M., 1966 - Contribution à l'étude du métabolisme azoté des halophytes ; acides aminés et amides d'Aster tripolium L. C.R. Acad. Sci., série D, 263, 260-263.

30. GOAS M., GOAS G. et LARHER F., 1970 - Métabolisme azoté des halophytes : utilisation de l'acide glutamique ^{14}C, 3-4, par les jeunes plantes d'Aster tripolium. C.R. Acad. Sci., série D, 271, 1763-1766.

31. GOAS M., 1971 - Métabolisme azoté des halophytes ; utilisation de la L proline ^{14}C (U) par les jeunes plantes d'Aster tripolium L. C.R.Acad. Sci., série D, 272, 414-417.

32. GRISON C. et MARTIN C., 1961 - Contribution à l'étude du comportement des virus végétaux chez leurs hôtes hypersensibles. Ann. Epiphyties, 12, 89-94.

33. HOLLEMAN J., 1967 - Direct incorporation of hydroxyproline into protein of Sycamore cells incubated at growth inhibiting levels of hydroxyproline. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), 57, 50-54.

34. HUBAC C., 1966 - Recherche de substances inhibitrices contenues dans les caryopses immatures de blé Fylgia. Thèse de Doct. Faculté des Sciences, Paris.

35. HUBAC C., 1967 - Accroissement chez des plantules de la résistance à la dessication par action préalable de la proline. C. R. Acad. Sci., série D, 264, 1286-1289.

36. KAWASHIMA N. et TAMAKI E., 1967 - Studies on protein metabolism in higher plant leaves. I. Amino acid compositions of tobacco leaf proteins at various stages. Phytochemistry, 6, 329-338.

37. KEMBLE A.R. and MAC PHERSON H.T., 1954 - Liberation of amino acids in perennial rye grass during wilting. Bioch. J., 58, 46-49.

38. KLYACHKO N.L. et KULAEVA O.N., 1965 - The periodicity of protein synthesis in tobacco leaves. Dokl. Akad. Nank. SSSR., 164, 216-218.

39. KUDREV T., 1970 - On the problem of the formation of prolin under the effect of drought. C.R. Acad. Sci. Agric. Bulgarie, 3, 261-264.

40. LAMPORT D.T.A. and NORTHCOTE D.H., 1960 (a) - Hydroxyproline in primary cell walls of higher plants. Nature, 188, 665-666.

41. LAMPORT D.T.A. and NORTHCOTE D.H., 1960 (b) - The use of tissue cultures for the study of plant cell walls. Biochem. J.,76,52 P.

42. LAMPORT D.T.A., 1963 - Oxygen fixation into hydroxyprolin of plant cell wall proteins. J. Biol. Chem., 238, 1438-1440.

43. LAMPORT D.T.A., 1965 - The protein component of primary cell walls. Advan. Bot. Res., 2, 151-218.

44. LAMPORT D.T.A., 1967 (a) - Evidence for hydroxyproline-o-glucosidic cross link in the plant cell wall glycoprotein extensin. Feder. Proc., 26, 608.

45. LAMPORT D.T.A., 1967 (b) - Hydroxyproline-o-glycosidic linkage of the plant cell wall glycoprotein extensin. Nature, 216, 1322-1324.

46. LARHER F., GOAS M. et GOAS G., 1970 - Metabolisme azoté des halophytes : utilisation de l'acide glutamique ^{14}C, 3-4, par les rameaux végétatifs de Limonium vulgare Mill. C.R. Acad. Sci., série D, 271, 1880-1883.

47. LARHER F., 1971 - Métabolisme azoté des halophytes : utilisation de la proline ^{14}C (U) par les rameaux végétatifs de plantes de Limonium vulgare Mill. soumises ou non à l'effet de l'eau de mer. C.R. Acad. Sci., série D, 272, 823-826.

48. LE SAINT QUERVEL A.M., 1966 - Thèse de doctorat. Rev. gen. Bot., 863, 161-239.

49. LE SAINT QUERVEL A.M., 1969 (a) - Variations comparées des teneurs en proline libre et en glucides solubles, en relation avec l'inégale sensibilité au gel des organes de plants de choux de Milan cult. Pontoise. C.R. . Acad. Sci., série D, 268, 310-313.

50. LE SAINT QUERVEL A.M., 1969 (b) - Influence de la lumière et rôle des feuilles dans l'endurcissement au gel chez le chou de Milan, cult. Pontoise. C.R. Acad. Sci., série D, 269, 443-446.

51. LE SAINT QUERVEL A.M., 1969 (c) - Corrélations entre la résistance au gel, l'éclairement et la teneur en proline libre chez le chou de Milan cult. Pontoise. C.R.Acad. Sci., série D, 269, 1423-1426.

52. LINDER R. et COUSTAUT D., 1966 - Bilan des Acides aminés dans le pollen et le style chez une espèce auto-incompatible Oenothera missouriensis. C.R. Acad. Sci., série D, 263, 1447-1450

53. LINSKENS H.F. et TUPY J., 1966 - The amino acids pools in the style of self incompatible strains of Petunia after self and cross pollination. Der Züchter, 36, 151-158.

54. LOWRY O.H., ROSENBROUGH N., FARR A.L. and RANDALL R.J., 1951 - Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. chem., 193, 265-275.

55. MARTIN C. et GALLET M., 1966 (a) - Contribution à l'étude de l'action de la température sur la réaction d'hypersensibilité de certains hôtes à l'égard du virus de la mosaïque du tabac. C.R. Acad. Sci., série D, 262, 646-649.

56. MARTIN C. et GALLET M., 1966 (b) - Hypersensibilité aux virus, température et induction florale chez les végétaux. C.R. Acad. Sci., série D, 262, 997-1000.

57. MARTIN C. et GALLET M. 1966 (c) - Nouvelles observations sur le phénomène d'hypersensibilité aux virus chez les végétaux. C.R. Acad. Sci., série D, 263, 1316-1318.

58. MAY J.T., GILLILAND J.M. and SYMONS R.H., 1970 - Properties of a plant virus induced RNA polymerase in particulate fractions of cucumbers infected with cucumber mosaic virus. Virology, 41, 653-664.

59. MAZELIS M. and FOWDEN L., 1971 - The metabolism of proline in higher plants. II - L Proline dehydrogenase from cotyledons of germinating peanut (Arachis hypogaea L) seedlings. J. Exp. Bot., 22, 137-145.

60. MIZRAHI Y., BLUMENFELD, BITTNER S. and RICHMOND A.E., 1971 - Abscisic acid and cytokinin contents of leaves in relation to salinity and relative humidity. Plant Physiol., 48, 752-755.

61. MIZUSAKI S., NOGUCHI M. and TAMAKI E., 1964 - Studies on nitrogen metabolism in tobacco plants. VI - Metabolism of glutamic acid, γ amino butyric acid and proline in tobacco leaves. Arch. Biochem. Biophys., 105, 599-605.

62. MOORE S. and STEIN W., 1954 - Procedures for the chromatographic determination of amino acids on fourpercent cross linked sulfonated polystyrene resines. J. Biol. Chem., 211, 893-913.

63. NOGUCHI M., YAMAMOTO K. and TAMAKI E., 1961 - Studies on the nitrogen metabolism in tobacco plants. I - Nitrogenous compounds in the tobacco sap. Agr Biol. Chem., 25, 626-631.

64. NOGUCHI M. and TAMAKI E., 1962 - Studies on nitrogen metabolism in tobacco plants. II - Diurnal variation in the amino acid composition of tobacco leaves. Arch. Biochem. Biophys., 98, 197-205.

65. NOGUCHI M., YAMAMOTO K., and TAMAKI E., 1964 - Studies on nitrogen metabolism in tobacco plants. V - Changes of the free amino acid composition of tobacco leaves with age. Tobacco science, 8, 8-12.

66. NOGUCHI M., KOIWAI A. and TAMAKI E., 1966 - Studies on nitrogen metabolism in tobacco plants. VII - pyrroline 5 carboxylate reductase from tobacco leaves. Agr. Biol. Chem., 30, 452-456.

67. NORRIS W.E., 1967 - Reversal of hydroxyproline induced inhibition of elongation of Avena coleoptiles. Plant Physiol., 42, 481-486.

68. OLSON A.C., 1964 - Proteins and plant cell walls : Prolin to hydroxyprolin in tobacco suspension cultures. Plant Physiol., 39, 543-550.

69. PALFI G. and JUHASZ J., 1968 - Changements de la teneur des plantes en acides aminés sous l'effet de la carence en eau et du sol salin. Agrokemia es talajtan, 17, 243-254.

70. PALFI G. and JUHASZ J., 1970 - Increase of the free prolin level in water deficient leaves as a reaction to saline or cold root media. Acta agron. Acad. Sci. hung., 19, 72-88.

71. PALFI G. and JUHASZ J., 1971 - The theoritical basis and practical application of a new method of selection for determining water deficiency in plants. Plant and soil, 34, 503-507.

72. PECH J.C., FALLOT J. et CARLES J., 1970 - La proline au cours de la conservation de la poire Passe-crassane. C.R. Acad. Sci., série D, 271, 1292-1295.

73. PERDRIZET E., 1963 - Etude des variations du métabolisme des feuilles de Pommes de terre provoquées par le virus de l'enroulement durant les premiers stades de l'infection. C.R. Acad. Sci., 257, 3208-3211.

74. PERDRIZET E., DAMERON P., GILLOT J., DOMMERGUES P. et MARTIN C., 1965 - Variations du métabolisme des acides aminés libres chez quelques mutants chlorophylliens de blé de printemps. C.R. Acad. Sci., 261, 3189-3192

75. PERDRIZET E., 1972 - Déviations du métabolisme glucidique et aminé dans différents cas de déficience chlorophyllienne d'origine pathologique ou génétique. Thèse de Doct. Faculté des Sciences, Dijon.

76. PILET P.E. et HAUF V., 1968 - Action de l'acide β indol acétique et de l'hydroxyproline sur l'allongement des segments de coleoptiles de Blé. C.R. Acad. Sci., série D, 266, 2335-2338.

77. POLLARD J.K. and STEWARD F.C., 1959 - The use of ^{14}C proline by growing cells : its conversion to protein and to hydroxyproline. J. Exp. Bot., 10, 17-32.

78. RAMIREZ C. and MILLER J.J., 1963 - Accumulation of free prolin during yeast sporogenesis. Nature, 197, 722-723.

79. ROUTLEY D.G., 1966 - Prolin accumulation in wilted Ladino clover leaves. Crop Science, 4, 358-361.

80. SADAVA D. and CHRISPEELS M.J., 1969 - Cell wall protein in plants : autoradiographic evidence. Science, 165, 299-300.

81. SADAVA D. and CHRISPEELS M.J., 1971 - Hydroxyproline biosynthesis in plants cells. Pepdidyl proline hydroxylase from carrots disks. Biochem. Biophys. Acta, 227, 278-287.

82. SAVITSKAYA N.N., 1967 - Accumulation of free prolin in barley plants in the presence of insufficient soil water. Soviet. Plant Physiol., 14, 622-624.

83. STAPLES R.C. and STHAMANM M.A., 1964- Changes in proteins and several enzymes in susceptible bean leaves after infection by the bean rust fungus Phytopathology, 54, 760.

84. STEIN W. and MOORE S., 1951 - Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. J. Biol. Chem., 192, 663-681.

85. STEINER H. and LANGE M., 1968 - Interaction between hydroxyproline and phytochrome controlling hypocotyl elongation in mustard seedlings (Sinapis alba L.). Die Naturwissenschatten, 55, 187-188.

86. STEWARD F.C. and THOMPSON J.F., 1950 - The nitrogenous constituents of plants with special reference to chromatographic methods. Ann. Rev. Plant. Physiol., 1, 233-264.

87. STEWARD F.C., POLLARD J.K., PATCHETT A.A. and WITKOP B., 1958 (a). The effects of selected nitrogen compounds on the growth of plant tissue cultures. Biochem. Biophys. Acta, 28, 308-317.

88. STEWARD F.C. and POLLARD J. K., 1958 (b) - ^{14}C prolin and hydroxyprolin in the protein metabolism of plants. Nature 182, 828-833.

89. STEWARD F.C., HOWE K.J., CRANE F.A. and RABSON R., 1962 - Growth, nutrition and metabolism of Mentha piperita L. CornellUniv. Agr. Expt. Sta. Mem., 379, 1-144.

90. STEWARD F.C. and CHANG L.D., 1963 - Incorporation of ^{14}C prolin into proteins of growing cells. II - a note on evidence from cultured carrot explants by acrylamide gel electrophoresis. J. Exp. Bot., 14, 379-386.

91. STEWARD F.C. and DURZAN D.J., 1965 - Metabolism of nitrogenous compounds. In Plant Physiology, IV, A, 379-686. Edx. by Steward F.C. (Acad. Press).

92. STEWARD F.C., MOTT R.L., ISRAEL H.W. and LUDFORD P.M., 1970 - Proline in vesicles and sporelings of Valonia ventricosa and the concept of cell wall protein. Nature, 225, 760-763.

93. STEWART C.R., MORRIS C.J. and THOMPSON J.F., 1966 - Changes in aminoacid content of excised leaves during incubation. II Role of sugar in the accumulation of proline in wilted leaves. Plant Physiol., 41, 1585-1590.

94. STEWART C.R., 1967 - The effect of water and oxygen content on changes in amino acid content of excised leaves and studies on prolin metabolism in wilted and unwilted leaves. Diss. Abstr. ser. B., 28, 25B.

95. SVHEDSKAYA Z. M. and KRUZHILIN A.S., 1966 - Variations of prolin content during vernalization and differentiation of growing points of biennal and winter plants. Fiziol. Rastenii, 13, 850-858.

96 THOMPSOM J.F., STEWART C.R. and MORRIS C.J., 1966 - Changes in amino acid content of excised leaves. I. The effect of water content of leaves and atmosphere oxygen level. Plant Physiol., 41, 1578-1584.

97. TRIONE E.J., YOUNG J.L. and YAMAMOTO M., 1966 - Metabolic changes associated with vernalization of wheat. I - carbohydrates and nitrogen patterns. Plant Physiol., 41, 277-281.

98. TRIONE E.J., YOUNG J.L. and YAMAMOTO M., 1967 - Free amino acid changes associated with vernalization of wheat. Phytochemistry, 6, 85-91.

99. TUPY J., 1961 - Investigation of free amino acids in cross, self and non pollinated pistils of Nicotiana alata. Biol. Plant., 3, 47-65.

100. ULRICH R., 1958 - Post harvest Physiology of fruits. Annu. Rev. Plant Physiol., 9, 385-416.

101. VALLEE J.C., PERDRIZET E. et MARTIN C., 1967 - Evolution de la teneur en certains acides aminés libres chez le Nicotiana Xanthi n. c. en fonction de la température et à différents stades de son développement. C.R. Acad. Sci., série D, 264, 1024-1027

102. VALLEE J.C., PERDRIZET E. et MARTIN C., 1968 - Les acides aminés libres chez Nicotiana Xanthi n. c. en fonction du du développement et de la température. Ann. Physiol. vég., 10, 237-250.

103. VALLEE J.C., PERDRIZET E. et VANSUYT G., 1969 - Gradient d'induction florale et équilibre en acides aminés libres dans la tige du Nicotiana Xanthi n. c. : influence des températures supra-optimales. C.R. Acad. Sci., série D, 269, 1190-1193.

104. VALLEE J.C. et PERDRIZET E., 1971 - Incorporation de proline ^{14}C (U) dans les protéines de Nicotiana Xanthi n. c. en fonction du stade de développement ; influence des températures supra-optimales. C.R. Acad. Sci., série D, 272, 227-230.

105. VALLEE J.C., PERDRIZET E. et VANSUYT G., 1972 - Utilisation de l'acide glutamique ^{14}C (U) dans la tige et les jeunes feuilles de Nicotiana tabacum var. Xanthi n. c., végétatif ou floral. C.R. Acad. Sci., série D, 274, 873-876.

106. VALLEE J.C., MARTIN C., PERDRIZET E., VANSUYT G. et PREVOST J., 1972 - Induction floral and ^{14}C Prolin metabolism in Nicotiana tabacum cv Xanthi n. c. (à paraître).

107. ZOLOTOVITCH G., TSIKOVA E. and TSIKOV D., 1970 - Free amino acids and sugars in the reproductive organs of tobaccos with cytoplasmic male sterility. C.R. Acad. Sci. Agricole (Bulgarie), 3, 201-206.

S O M M A I R E

°°°°°°°°°

INTRODUCTION 3

MATERIEL ET TECHNIQUES 7

A - LE MATERIEL VEGETAL 7

- Les acides aminés libres du tabac..... 10

B - CONDITIONS EXPERIMENTALES 11

- Conditions de culture..... 13

C - TECHNIQUES D'EXTRACTION ET DE DOSAGE 16

1 - Extraction et purification..... 16

a) Les acides aminés..... 16

b) Les protéines..... 18

Séparation électrophorétique des protéines solubles..... 20

2 - Dosages..... 21

a) Les acides aminés libres et protéiques..... 21

b) Les protéines..... 21

3 - Utilisation d'éléments radioactifs..... 23

Eléments radioactifs utilisés..... 27

a) Détermination de la radioactivité des protéines après séparation électrophorétique..... 27

b) Répartition des éléments radioactifs dans les feuilles de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c... 28

4 - Mesure du contenu en eau des tissus et de son renouvellement..... 31

CHAPITRE I 33

EVOLUTION DES TENEURS EN ACIDES AMINES EN FONCTION DU DEVELOPPEMENT ET DE LA TEMPERATURE 34

A - EVOLUTION EN FONCTION DU DEVELOPPEMENT. INFLUENCE D'UN COURT PASSAGE A 32°C 34

a) Pour les plantes restées n + 72 heures à 20°C.. 35

b) Pour les plantes placées n heures à 20°C, puis 72 heures à 32°C..... 37

B - COMPARAISON DE TENEURS EN ACIDES AMINES LIBRES DE PLANTES ELEVEES A 20°C OU A 32°C 44

C - COMPARAISON DES TENEURS EN PROLINE DE TABACS A 20°C ET 32°C SOUS DES TENEURS EN EAU IDENTIQUES DE L'ATMOSPHERE 47

D - INFLUENCE DE L'HEURE DE PRELEVEMENT AU COURS DE LA PERIODE LUMINEUSE 50

E - ANALYSE DES ACIDES AMINES LIBRES CHEZ DES TABACS PHOTOPERIODIQUES 53

CHAPITRE II 56

LOCALISATION DES VARIATIONS DE TENEUR EN PROLINE LIBRE CHEZ NICOTIANA TABACUM var. XANTHI n.c. 57

A - COMPARAISON INFLORESCENCE-FEUILLES D'UNE MEME PLANTE; INFLUENCE DE LA TEMPERATURE 57

B - TENEUR EN PROLINE LIBRE DES FEUILLES DE NICOTIANA TABACUM var. XANTHI n.c., AVANT ET APRES APPARITION DES FLEURS 60

C - GRADIENT DE PROLINE AU NIVEAU DE LA TIGE 63

a) Gradient de Proline libre chez *Nicotiana tabacum* var. Xanthi n.c..... 63

b) Gradient de Proline chez *Nicotiana sylvestris*... 68

- en fonction de la température..... 70

- en fonction de la photopériode..... 72

D - ANALYSE COMPAREE ENTRE 20°C et 32°C DES DIFFERENTES PARTIES D'UNE FLEUR 74

Analyse des différents tissus de la fleur avant la déhiscence des anthères..... 74

CHAPITRE III 82

ETUDE DU METABOLISME DE LA PROLINE EN FONCTION DU DEVELOPPEMENT ET DE LA TEMPERATURE 83

A - METABOLISME DE LA PROLINE ^{14}C (U) 83

a) Absorption de proline ^{14}C seule..... 83

Durant la phase végétative..... 83

Durant la phase florale..... 85

b) Utilisation de proline ^{14}C fournie avec du glucose..... 92

c) Répartition de la proline ^{14}C dans diverses fractions extraites suivant l'âge et le stade de la plante..... 94

B - UTILISATION D'AUTRES ACIDES AMINES RADIOACTIFS 104

a) Absorption d'acide glutamique ^{14}C (U)..... 105
b) Absorption d'arginine ^{14}C ou de leucine ^{14}C..... 109

C - MESURE DE L'ABSORPTION DE L'EAU PAR LE "SOMMET" DE NICOTIANA TABACUM var. XANTHI n.c. 112

D - TRAVAUX SUR LES PROTEINES 114

a) Composition en acides aminés des protéines de feuilles issues de plantes végétatives ou florales 115
b) Dosage des protéines solubles de feuilles de tabacs végétatifs ou floraux. Influence d'un transfert à 32°C..... 115
c) Répartition de la radioactivité dans les protéines solubles extraites de feuilles de tabacs végétatifs et floraux après absorption de Proline ^{14}C..... 117

CONCLUSION GENERALE - DISCUSSION 123

a) La proline et l'hydroxyproline dans les protéines de la paroi..... 123
b) La proline libre au cours d'un "stress"..... 126

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 133

Vu et permis d'imprimer

DIJON, le 22 novembre 1972

La Présidente de l'Université :

Madame MORET-BAILLY.